Agriculture Canada

FOOD PRODUCTION AND INSPECTION BRANCH / DIRECTION GÉNÉRALE, PRODUCTION ET INSPECTION DES ALIMENTS	DATE: October 31, 1980	T-1-215
	SECTION: PESTICIDES	
RE / OBJET: TRADE MEMORANDUM		

RE: Efficacy Data for Antimicrobial Products

The purpose of this Memorandum is to inform registrants of the efficacy data which will be required in support of the registration of antimicrobial products. For information on requirements for new antimicrobial active ingredients, consult Trade Memorandum T-1-223 and the Registration Guidelines.

Section 4 of the Pest Control Products Act requires that antimicrobial products imported into or sold in Canada must be registered. Exemptions to this requirement are listed in Section 3 of the Regulations under the Pest Control Products Act and are described in Trade Memorandum T-1-214.

For purposes of the Pest Control Products Act, an antimicrobial product is defined as any product used for the control of bacteria, fungi, viruses or other microbes in or on inanimate objects and the environment except food or feed. The term "antimicrobial product" includes such subcategories as:

1. Disinfectants (including sterilizers, germicides, bactericides, sporicides, fungicides, and virucides);

2. Sanitizers;

3. Slimicides;

4. Microstatic agents.

When labels for antimicrobial products are submitted as requested in the Pest Control Products general "Registration Guidelines", antimicrobial label claims subject to regulation under the Pest Control Products Act must be supported by efficacy data as outlined in the attached "Guidelines for Registering Antimicrobial Products".

Submission of the above information for each product will allow the earliest possible review of the data and label and provide an opportunity for the development of any additional data that may be required.

Four bound copies of all submitted information should be sent to the following address:

Pest Management Regulatory Agency
Health Canada
2250 Riverside Drive
A.L. 6606D1
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

S.W. Ormrod
Associate Director (Pesticides)
Plant Products and Quarantine Division

This replaces Memoranda R-1-53, dated June 17, 1974 and T-1-215, dated February 14, 1980.

Distribution: PPD-2; PCP-1,2,3,4,5,8,10,12

GUIDELINES FOR REGISTERING ANTIMICROBIAL PRODUCTS

These guidelines are primarily concerned with the efficacy data requirements to support claims made in labelling. In addition, copies of enclosures that are frequently provided to registrants by the Environmental Protection Agency and pertinent references relating to testing of such products are included.

These guidelines are subject to change. Continuous efforts are being made to devise new methods, improve existing ones through collaborative testing and to involve a greater number of persons and firms in the program to develop test methods for adequately evaluating the efficacy of products. The applicant should assure himself that the test method selected to substantiate efficacy is current and applicable to the product proposed for registration. For purposes of identification, where reference is made to test codes in this Appendix, see Table I under "Tests for Efficacy".

Efficacy data requirements for registration are desinged to provide:

1. Some evidence that the applicant can reproduce the product formula so that it will have the same level of activity.

2. Evidence that the formula which is being offered for sale will have reasonable shelf-life.

3. A sufficient volume of testing so that deficiciencies which may be subsequently found in the Laboratory Services Division cannot be ascribed to variations in testing which may be encountered among different laboratories.

Reference to "preparation" in the requirements below means individually formulated preparations of the product, either in the laboratory or from production.

Data Requirements

Minimal Disinfectant Claims

Minimal disinfectant claims must be substantiated with efficacy data derived from either the AOAC Use Dilution Method (liquid products) or the AOAC Germicidal Spray Products Method (spray products). Required are sixty replicates on each of three samples, representing three different preparations against Salmonella choleraesuis. One of these preparations aged to represent a 60-day shelf-life stability study must also be tested with 30 replicates on duplicate samples against S. choleraesuis. See Test D-01.010R.70 for Use-Dilution Method and Test D-10.060R-70 for Germicidal Spray Products Method.

General Disinfectant Claims

General disinfection claims are much broader than minimal claims and must be substantiated with the efficacy data required for minimal claims, along with efficacy data derived from two other test species. Sixty replicates are required on each of three samples, representing three different preparation, against S. choleraesuis. In addition thirty replicates on each of these three samples against Staphylococcus aureus and one other pathogen exclusive of S. aureus and S. choleraesuis must be tested. One of these preparations aged to represent a 60-day shelf-life stability study must also be tested with 30 replicates on duplicate samples against S. choleraesuis. See Test D-01.010R-70 for Use Dilution Method and Test D-01.060R-70 for Germicidal Spray Products Method.

Phenol Coefficient Claim

Any phenol coefficient claim requires testing by the AOAC Phenol Coefficient Method in duplicate on one preparation against Salmonella typhosa. Where a phenol coefficient is declared against any other bacterium the test also must be run against each bacterium named. See Test D-01.020R-70, Phenol Coefficient Method.

Claims Against Pathogenic Fungi

Claims against specific pathogenic fungi must be supported with efficacy data derived from duplicate samples of one preparation using the AOAC Fungicidal Test. See Test D-01. 030R-70.

Claims against Mycobacterium tuberculosis

Claims against M. tuberculosis must be substantiated with efficacy data derived from the AOAC Tuberculocidal Activity Method (Test D-01.040R-70) on one preparation of the product (liquid) under test. If the product is a spray, the procedure must be modified to conform with the AOAC Germicidal Spray Product Method (Test D-01.060R-70) using the media, microorganisms, etc., described in the AOAC Tuberculocidal Activity Method.

Disinfectant Claims Against Other Microorganisms

Claims for effectiveness against specific microorganisms other than those named in the AOAC Use Dilution Method (Test D-01.010R-70) or the AOAC Germicidal Spray Products Method (Test D-01.060R-70) can be accepted only when supported by efficacy data derived from ten replicates on one preparation against each microorganism claimed.

Sporicidal Claims

All sporicidal claims must be substantiated with efficacy data derived from the AOAC Sporicidal Test (Test D-04.010R-70). The test requires thirty replicates on each of two kinds of carriers (porcelain penicylinders and surgical silk suture loops) against spores of both Bacillus subtilis and Clostridium sporogenes on three different preparations (total of 120 carriers on each preparation). Thirty carriers of each type must also be tested against spores of either microorganism on duplicate samples of one of the three preparations, aged to represent a 60-day shelf-life stability (total of 120 carriers for the stability test). Added claims for effectiveness against spore-forming organisms other than B. subtilis and C. sporogenes must be substantiated with data derived from 30 replicates (porcelain penicylinders) on one preparation.

Sterilizing Claims

The AOAC Sporicidal Test (Test D-05.010R-70 and Enclosure DIS-12) is used as the basis for substantiating sterilizing claims. Since "sterilizer" is an absolute term (to destroy all living things), the data requirements supporting a sterilizing claim are greater than those required to support a sporicidal claim. The basic data (360 carriers) called for under "Sporicidal Claims", apart from the 60-day shelf-life study, is also required for sterilizing claims. In addition, 30 carriers of each type must be tested against spores of B. subtilis and C. sporogenes on duplicate samples of one preparation, aged to represent a 60-day shelf-life stability study (total of 240 carriers, plus 360 carriers equals 600 carriers). No growth must be observed in any of the subculture or resubculture tubes from the 600 carriers.

Virucidal Claims

To support virucidal claims, the registrant is referred to enclosure DIS-13, entitled "Methods for Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants" (Test D-06-010S-72).

Sanitizing Rinses

Sanitizing rinse claims for iodophors, mixed halides and chlorine-bearing chemicals must be substantiated with efficacy data derived by the Available Chlorine Germicidal Equivalent Concentration Method (Test D-03.020R-70). Data from one test on each of three samples representing three different preparations, showing the concentrations of the product equivalent in activity to the reference standards of 50, 100 and 200 ppm of available chlorine as sodium hypochlorite, against S. typhosa are required. Data from duplicate samples of one of these preparations, representing a 60-day shelf-life stability study, showing concentrations of the product equivalent in activity to the three reference standards must be furnished. Chemical analyses may be substituted for biological testing on the 60-day sample.

Sanitizing rinse claims for quaternary ammonium compounds, chlorinated trisodium phosphate and anionic detergent-acid formulations must be substantiated with efficacy data derived by the Germicidal and Detergent Sanitizers Method (Test D-03.010R-70). Data from one test on each of three different preparations against both E. coli and S. aureus are required, along with data from duplicate samples of one of these preparations representing a 60-day shelf-life stability study against E. coli. When claims for the effectiveness of the product in hard water are made, data derived from test on duplicate samples of one preparation against both E. coli and S. aureus are required at the hard water tolerance claimed.

In testing the efficacy of detergent sanitizers, it may be necessary to modify the AOAC standardized tests to include appropriate neutralizers that are not specified in the methods. For example, in testing chlorinated trisodium phosphate, sodium thiosulfate is required to neutralize the residual chlorine.

Laundry Additives

Residual bacteriostatic claims for laundry additives must be substantiated with efficacy data derived from the AOAC Bacteriostatic Activity of Laundry Additives Method (Test D.02.010R072). Three samples representing three product preparations are tested, with five 1-inch square treated swatches against S. aureus and Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352 on seeded agar for each sample. Duplicate samples of one preparation representing 60-day shelf-life stability must be tested with five replicate fabric swatches on agar seeded with S. aureus.

For products bearing sanitizing claims, the method of Petrocci and Clarke may be employed to provide efficacy data to support registration (See Test D-03.070T-69), since no official test method is available. Tests may be carried out in a washing machine in lieu of the Petrocci and Clarke method. The test organisms are K. pneumoniae, ATCC 4352 and S. aureus, ATCC 6558. General protocols, propagation of cultures, fabric to water ratios, test materials, water temperatures and subculture media must be the same as specified in Test D-03.070T-69. Tests must be conducted with three samples representing three product preparations, each sample tested with three replicate fabric swatches against the two test bacteria specified. One sample representing a 60-day shelf-life storage must be tested in duplicate against S. aureus. A 99.9% reduction within 10 minutes must be demonstrated over the control counts.

To support disinfecting claims, the Petrocci and Clarke method (Test D-03.070T-69) is employed; however, the tests are conducted with three samples representing three product preparations, each sample tested with 30 replicate fabric swatches against the two test bacteria specified. One sample representing 60-day shelf-life storage must be tested in duplicate with 15 swatches against S. aureus. The method must be modified to include testing of both the fabric and the wash water (5 ml from the automatic washer or 0.5 ml from the container with the test device) in individual wide-mouth jars containing subculture media and neutralizers. The added wash water to media volume ratio should not exceed 1:40. Growth or no growth is noted after 48 hours incubation.

The data requirements outlined above for laundry additives do not apply to sodium-calcium hypochlorites, sodium-potassium dichloro-s-triazinetriones or trichloro-s-triazinetrione.

Textile Preservatives

Methods prescribed by the American Association of Textile Colorists and Chemists involving agar plates (see Test D-02.020S-65) or liquid culture media (see Test D-02.030S-65) may be employed to support residual bacteriostatic claims.

Air Sanitizers

No standard method of evaluating air sanitizer claims has been adopted. Reports by Stuart and Friedl, by McGray, and the British Standards Institution describe methods of testing aerosol products designed for the temporary sanitization of air spaces. Several investigators have shown that the incorporation of glycols (triethylene, propylene or dipropylene glycol) in pressurized formulations at concentrations of 5 to 10 percent cause significant reductions of air-borne bacteria when adequate vapor concentrations are achieved. Currently, since no standard method of evaluating such products is available, registration requirements regarding efficacy are satisfied by chemical analysis data showing appropriate concentrations of glycols. Air sanitizing products that do not contain such concentrations of glycols must be evaluated by a room or chamber technique; a significant reduction of air-borne microorganisms must be demonstrated. The primary test organism is S. aureus. Depending on the intended use pattern, other organisms such as Salmonella or Pseudomonas, may also be used to provide efficacy data.

Carpet Sanitizers

No final official method exists for testing the efficacy of carpet sanitizers; however, a tentative method has been developed through the efforts of the AOAC and is delineated under the tests listed later in this section of the Appendix (see Test D-03.040T-71). If this test is employed to derive data to support the registration of a carpet sanitizer, the following protocols must be considered:

a. Three product samples representing three separate preparations must be tested against each of the two bacteria specified in the method with two different types of carpet. A 99.9% reduction of test bacteria over the control count must be demonstrated in each case. If the product is intended for use on commercial-grade carpeting, two representative carpets such as "acrylic" and "polypropylene" tufted-loop type may be tested. No carpeting is available to serve as a standard. If the product is intended for use on wool carpeting, an additional representative sample must be tested. If not, the label must bear a disclaimer for such use. All carpet samples tested must be fully identified, and the pile fiber type, pile yarn weight of finished carpet, pile density and tuft height reported. Adequate controls must demonstrate that bacteriostatic agents in the carpet pile or backing do not interfere with the test results.

b. One sample preparation representing a 60-day shelf-life stability study must be tested with one carpet sample and one test bacterium.

The amount of sanitizer applied to a piece of carpet must be extrapolated to gallons of diluted shampoo to square feet of carpet and this must be declared on the proposed label. We would expect this to be 12 gallons of dilute product to 800 to 1200 square feet of carpet.

Swimming Pool

Swimming pool water disinfectant claims must be substantiated with efficacy data derived from the AOAC Swimming Pool Water Disinfectants Method (Test D-01.050R-70). Data from one test on each of three different preparations against both E. coli and Streptococcus faecalis are required. Data from duplicate samples of one preparation representing a 60-day shelf-life stability study against E. coli must be submitted.

The data requirements outlined above for swimming pool water disinfection do not apply to simple formulations of sodium-calcium hypochlorites, sodium-potassium dichloro-s-triazinetriones, or trichloro-s-triazinetrione when adequate directions for pool water maintenance are provided on the product label.

Miscellaneous Products

Adequate tests have been developed for demonstrating efficacy of a few products that do not logically fall into the above categories. Included are methods for testing antimicrobial products to control the deterioration of paints or to control the contamination of hydrocarbon/water systems in the fuel industry. Details of the methods are provided in publications from the American Society for Testing and Materials, the American Petroleum Institute or the Society for Industrial Microbiology; references to the published methods are given on page 8.

Tests for Efficacy

The following list of tests (Table 1) are used to support the claims for various disinfectant-type products. The test code number indicates the broad category of products considered in these guidelines ("D" used with disinfectant type products), the specific product (01. = disinfectants; 02. = bacteriostats; 03. = sanitizers; 04. = sporicides; 05. = sterilizers; 06. = virucides; 07. = miscellaneous types not classified otherwise), the status of the test (R = required, official test; T = tentative test, usually under collaborative study; S = suggested, unofficial test not yet developed to the state requiring collaborative study), and "65", "69", "70", etc., indicating the most recent date associated with the development of the test.

Complete references to cited published tests are provided at the end of this section. Tentative or suggested tests, usually provided as enclosures by microbiologists of the Pesticides Regulation Division, Environmental Protection Agency, are also provided at the end of this document.

TABLE 1. Methods for Testing Efficacy of Disinfectant Type Products

Test Code Number	Product or Claim	Method
D-01.000	Disinfectants	
D-01.010R-70	Minimal disinfectant claims	AOAC Use Dilution
D-01.010R-70	General disinfectant claims	AOAC Use Dilution
D-01.020R-70	Phenol coefficient claims	AOAC Phenol Coefficient
D-01.030R-70	Pathogenic fungi claim	AOAC Fungicidal Test
D-01.040R-70	Tuberculosis claim	AOAC Tuberculocidal Activity
D-01.010R-70	Other microorganisms claim	AOAC Use Dilution
D-01.050R-70	For swimming pools	AOAC Water Disinfectants for Swimming Pools
D-01.060R-70	Spray products	AOAC Germicidal Spray Products
D-01.070T-69	Laundry wash water or fabric	Petrocci and Clarke
D-02.000	Bacteriostats	
D-02.010R-12	For laundry	AOAC Bacteriostatic Activity of Laundry Additives
D-02.020S-65	For fabrics	AATCC Test 90-1965
D-02.030S-65	For fabrics	AATCC Test 100-1965
D-03.000	Sanitizers	
D-03.010R-70	Quaternary ammonium or detergent-acid formulations	AOAC Germicidal and Detergent Sanitizers
D-03.020R-70	Iodophors, chlorine and mixed halide products	AOAC Available Chlorine Germicidal Equivalent Conc.
D-03.010R-70	Hard water claims	AOAC Germicidal and detergent sanitizers
D-03.030	Air sanitizers	Simulated In-Use
D-03.040T-71	For carpets	PRD Enclosure DIS-15
D-03.050T-71	For non-food contact surfaces	PRD Enclosure DIS-5
D-03.060T-72	For residues on hard surfaces	PRD Enclosure DIS-14
D-03.070T-69	For laundry wash water or fabric	Petrocci and Clarke

TABLE 1. (cont.) Methods for Testing Efficacy of Disinfectant Type Products

Test Code Number	Product or Claim	Method
D-04.000	Sporicides	
D-04.010R-70	Sporicide products	AOAC Sporicidal Test
D-05.000	Sterilizers	
D-05.010R-70	Sterilizers(chemical).	AOAC Sporicide Test and PRD Enclosure DIS-12
D-06.000	Virucides	PRD Enclosure DIS-13
D-07.000	Miscellaneous	
D-07.010R	Oil well subsurface injection water additives	American Petroleum Institute
D-07.020T-67	In can paint preservative	ASTM Test D-2574-67T
D-07.030S-66	Antimicrobial fuel additives	Proposed procedure of the Society for Industrial Microbiology

Standard Enclosures

Various standard enclosures have been prepared by the Environmental Protection Agency for distribution to registrants. Copies of the enclosures are reprinted in the following pages; the titles and numbers are as follows:

Title	Code Number
Efficacy Data Requirements - I	DIS-1
Efficacy Data Requirements - II	DIS-2
Efficacy Data Requirements - III	DIS-3
Special Directions for Poultry House Disinfectants	DIS-4
Sanitizer Test (for inanimate, non-food contact surfaces)	DIS-5
Bacteriostats, Sanitizers and Disinfectants Used for Laundering Textiles	DIS-6
Duplicated Product Formulations Based on Data Provided by Basic Manufacturers	DIS-7
Product Formulations Identical to Registered Products	DIS-8
Formulations Produced by Simple Aqueous Dilutions of Registered Concentrates	DIS-9
Tentative Test Method for Laboratory Evaluation of Rug and Carpet Sanitizers or Bacteriostats	DIS-10
Special Directions for Cresylic Acid and Synthetic Phenols (For Use as Farm Premise Disinfectants which Permit Classification as Non-Food Use)	DIS-11
Efficacy Data Requirements for Sterilizing Claim	DIS-12
Methods for Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants	DIS-13
Tentative Residual (Self-Sanitizing) Method	DIS-14

Efficacy Data Requirements - I

A. For Disinfectants (Minimal or general claims):

A.O.A.C. Use Dilution Method; ( ) A.O.A.C. Germicidal Spray Method

Sixty replicates on each of three samples, representing three different preparations against:
( ) Staphylococcus aureus, ( ) Salmonella choleraesuis.

Thirty replicates on each of three samples, representing three different preparations against:
( ) Staphylococcus aureus, ( ) Salmonella choleraesuis,
( ) Pseudomonas aeruginosa, ( ) Trichophyton interdigitale,
( ) One pathogen (exclusive of S. aureus and S. choleraesuis).

Thirty replicates each on duplicate samples of one preparation, representing a 60-day shelf-life stability study against:
( ) S. aureus, ( ) S. choleraesuis.

Ten replicates on one sample against each other pathogen claimed.

B. Phenol Coefficient Data:

A.O.A.C. Phenol Coefficient Tests in duplicate on one sample of one preparation against:
( ) Salmonella typhosa, ( ) S. aureus, ( ) all other pathogens claimed.

C. Fungicidal, Tuberculocidal, or Virucidal Tests:

A.O.A.C. Fungicidal Test on duplicate samples of one preparation.

A.O.A.C. Tuberculocidal Test on one preparation (one sample).

A.O.A.C. Tuberculocidal Test Modified to conform with the A.O.A.C. Germicidal Spray Method, on one preparation (one sample).

Acceptable Virological Techniques. Data on one sample in duplicate against all specific viruses named on the label.

NOTE: It should be understood that where test organisms other than those specified in the Methods outlined above are substituted therein, the media, incubation time, and other factors will all be evaluated in terms of the significance of the results claimed.

Reference: A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 11th Ed., Chapter 4 - Disinfectants, pp. 59 - 74, 1970.

Efficacy Data Requirements - II

D. Seeded Agar Plate Test. Procedure as in AATCC 90-1965, B 175-176, 1966, Technical Manual of American Association of Textile Chemists and Colorists, Vol. 40, 1968. (Modified to replace fabric carrier with appropriate hard surface carrier such as steel or ceramics.)

( ) Three samples representing three different preparations of formula or material. Five 1-inch square samples of material or material treated as directed with formula using ( ) S. aureus, ( ) E. coli.

( ) Duplicate samples of one preparation following 60-day storage stability study employing five 1-sq. in. samples using S. aureus.

E. A.O.A.C. Germicidal and Detergent Sanitizer Test:

( ) Three samples representing three different preparations each against both Escherichia coli and Staphylococcus aureus.

( ) Duplicate samples of one preparation representing a 60-day shelf-life stability study, each against E. coli.

Note: If hard water uses are indicated, the above tests must be conducted in the hard water at the tolerances claimed instead of distilled water.

F. A.O.A.C. Available Chlorine Germicidal Equivalent Concentration Test:

( ) Three samples representing three different preparations, showing the concentrations of the formulation equivalent in activity to the three reference standards of 50, 100, and 200 ppm av. Cl. as sodium hypochlorite, using Salmonella typhosa.

( ) Duplicate samples of one preparation, representing a 60-day shelf-life stability study*, showing the concentrations of the formulation equivalent in activity to the three reference standards.

*Chemical analysis may be substituted for biological testing for organic chlorine-bearing chemicals.

NOTE: It should be understood that where test organisms other than those specified in the Methods outlined above are substituted therein, the media, incubation time, and other factors will all be evaluated in terms of the significance of the results claimed.

Reference: A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 11th Ed., Chapter 4 - Disinfectants, pp 59 - 74, 1970.

Efficacy Data Requirements - III

G. A.O.A.C. Swimming Pool Water Disinfectant Method:

( ) Three samples representing three different preparations against Escherichia coli and Streptococcus faecalis.

( ) Duplicate samples of one preparation representing a 60-day shelf-life stability study against Escherichia coli.

( ) Field Tests in Swimming Pools as prescribed in NSF Standards, showing no more than 15% of samples exceed standard plate count of 200 colonies per ml., 2.2 coliforms per 100 ml., or 2.2 enterococci per 100 ml. (National Sanitation Foundation, P.O. Box 1468, Ann Arbor, Michigan 48106.)

H. A.O.A.C. Sporicidal Test:

( ) Three samples representing three different preparations using: both types of carriers (porcelain penicylinders and surgical silk suture loops); both test organisms (Bacillus subtilis and Clostridium sporogenes); thirty replicates with each organism, on each type of carrier (Total of 120 replicates or carriers).

( ) Duplicate samples of one preparation representing a 60-day shelf-life stability study using: 30 replicates with one test organism on both types of carriers.

( ) Duplicate samples of one preparation representing a 60-day shelf-life stability study using: 30 replicates with both test organisms named above on both types of carriers. (Total of 120 replicates or carriers for each sample.)

( ) One sample of one preparation using 30 replicates (porcelain penicylinders) for each spore-forming organism named other than B. subtilis and Cl. sporogenes.

NOTE: It should be understood that where test organisms other than those specified in the Methods outlined above are substituted therein, the media, incubation time, and other factors will all be evaluated in terms of the significance of the results claimed.

Reference: A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 11th Ed., Chapter 4 - Disinfectants, pp 59 - 74, 1970.

Special Directions for Poultry House Disinfectants

1. Remove all poultry and feeds from premises, trucks, coops, crates.

2. Remove all litter and droppings from floors, walls, and surfaces of facilities occupied or traversed by poultry.

3. Empty all troughs, racks, and other feeding and watering appliances.

4. Saturate surfaces with recommended solution.

5. Ventilate buildings, coops and other closed spaces. Do not house poultry or employ equipment until treatment has been absorbed, set, or dried.

6. All treated feed racks, mangers, troughs, automatic feeders, fountains, and waterers must be thoroughly rinsed with potable water prior to reuse.

NOTE: The above directions for use must appear on labeling of products containing cresylic acid, synthetic phenols, pine oils or quaternary ammonium compounds.

SANITIZER TEST
(for inanimate, non-food contact surfaces)

To substantiate the sanitizing claims for a product, the applicant must submit data prior to registration to show that the product, when used as directed, will substantially reduce the numbers of test microorganisms on a surface over that afforded on an untreated control surface. The following protocol may be utilized.

Product samples representing three different preparations must be tested against each test bacterium on each representative surface. In addition, one sample preparation representing a 60-day shelf-life stability study must be tested in duplicate using one test bacterium. The test microorganisms may be: Staphylococcus aureus ATCC 6538 and Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352; Enterobacter aerogenes ATCC 13048 may be substituted for K. pneumoniae. Representative test surfaces may include, but are not limited to, glass, metal, unglazed or glazed ceramic tile, or vitreous china, depending on the uses proposed on the label. The propagation of cultures and the use of subculture media and other related equipment should be specified in sections 4.001 and 4.002 of the current A.O.A.C. Manual of Methods.

Determine the count of bacteria in an 18 to 24-hour culture and add a 0.01 to 0.03 ml. quantity of the broth culture by spreading on 1 X 1 inch squares of test surface using a bacteriological loop. The squares should be dried for 20 to 30 minutes in a bacteriological incubator at 30 to 37 C. A "zero time" bacterial numbers recovery test must be performed to show the efficiency of the recovery process and must be reported. The "zero time" test should show the loss in viability that occurred during the drying. Apply the product to the test surface as directed on the label. After a suitable time interval, recover test organisms by washing the squares with adequate agitation in appropriate media or diluting fluid containing appropriate neutralizers. Make plate counts on appropriate nutrient agar containing the same neutralizers by the pour or spread plate technique. Exposure time intervals between zero time and ten minutes should be tested for the product as well as for the untreated controls.

The results must show a bacterial reduction of at least 99.9% over the parallel control count within 5 minutes. Three test surfaces with each test microorganism must be tested against each sample for a total of nine determinations with each bacterium. The 60-day shelf-life study should be carried out with two test surfaces against one test bacterium.

BACTERIOSTATS, SANITIZERS AND DISINFECTANTS USED FOR LAUNDERING TEXTILES

Products Bearing Residual Bacteriostatic Claims on Fabric:

( ) All tests are to be carried out by the A.O.A.C. Bacteriostatic Activity of Laundry Additives Test, as specified in the second Supplement to the 11th Edition, Official Methods of Analysis - A.O.A.C. (J.A.O.A.C., 55 (2): 400-402, 1972). Three samples representing 3 product preparations are tested, with five 1-inch square treated swatches against S. aureus and Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352 on seeded agar for each sample. Duplicate samples of one preparation representing 60-day shelf-life stability must be tested with 5 replicate fabric swatches on agar seeded with S. aureus.

Products Bearing Sanitizing or Disinfecting Claims for Fabric and/or Laundry Wash-Water:

An Official test method is not available for assessing the efficacy of products in this category. Refer to the J.A.O.A.C., 52 836-838, 1969 for appropriate test protocols of a tentative method. The gram-negative test bacterium is Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352. Tests may be carried out in a washing machine or in the devices specified in the tentative method. General protocols, propagation of cultures, fabric to water ratios, test materials, water temperatures and subculture media must be the same as that specified in the tentative method.

( ) Sanitizing Claims: Three samples representing 3 product preparations, each sample tested with 3 replicate fabric swatches against the 2 test bacteria specified. One sample representing a 60-day shelf-life storage must be tested in duplicate against Staphylococcus aureus. A 99.9% reduction within 10 minutes must be demonstrated over the control counts.

( ) Disinfecting Claims: Three samples representing 3 product preparations, each sample tested with 30 replicate fabric swatches against the 2 test bacteria specified. One sample representing 60-day shelf-life storage must be tested in duplicate with 15 swatches against S. aureus. The method must be modified to include testing of both the fabric and the wash water (5 ml from the automatic washer or 0.5 ml from the container with the test device) in individual wide-mouth jars containing subculture media and neutralizers. The added wash water to media volume ratio should not exceed 1:40. Growth or no growth is noted after 48 hours incubation.

The data requirements outlined herein do not apply to sodium-calcium hypochlorites, sodium-potassium dichloro-s-triazinetriones or trichloro-s-triazinetrione.

DUPLICATED PRODUCT FORMULATIONS
Based on Data Provided by Basic Manufacturers

With products proposed for registration that duplicate a fomulation which is registered but not intended to be marketed by a basic manufacturer, the data developed and on file may be applied provided:

( ) 1. A formal letter of authorization from the basic manufacturer granting access to his file is submitted.

2. The following efficacy data are developed on the applicant's own finished product:

( ) A. General Disinfectants

(1) A.O.A.C. Use-Dilution Method
(2) Thirty replicates on each of two samples against Salmonella choleraesuis

( ) B. Sanitizers as terminal rinses for glassware, utensils, or equipment in restaurants, bars, dairies and food processing plants.

(1) A.O.A.C. Germicidal and Detergent Sanitizers Test
(2) One test on one sample employing escherichia coli. Test must be performed in proper hard-water if label claim for hard-water tolerance is made.

( ) C. Pressurized spray disinfectants

(1) Certification that all materials and devices making up the container are identical to those specified by the basic manufacturer
(2) A.O.A.CI Germicidal Spray Products Test
(3) Thirty replicates on each of two samples against S. aureus and S. choleraesuis.

PRODUCT FORMULATIONS IDENTICAL TO REGISTERED PRODUCTS

Products proposed for registration that are identical to products already registered, manufactured and marketed by a basic registrant may be accepted provided:

( ) 1. A formal letter of authorization granting access to the registered product file is submitted.

( ) 2. A document substantiating that the product is manufactured and/or formulated by the basic registrant for the proposed applicant is submitted.

( ) 3. If the proposed product, other than a pressurized spray, is to be manufactured and/or formulated by the applicant, the criteria set forth and marked in enclosure "Duplicated Products Formulations" must be complied with.

( ) 4. If the product is a pressurized spray, it must be shown that all materials and devices are identical to those utilized by the basic registrant; furthermore, the filler packaging company must be the same for both products. If this cannot be documented and substantiated, the applicant must submit complete efficacy data by the A.O.A.C. Germicidal Spray Products Test on his own product.

FORMULATIONS PRODUCED BY SIMPLE AQUEOUS DILUTIONS OF REGISTERED CONCENTRATES

The basic efficacy data developed by the supplier of the registered concentrate may be utilized under the following guidelines:

I. Written authorization for use of his file on behalf of the applicant must be submitted by the supplier.

II. Data to confirm that the diluted product can be expected to be effective when used as directed must be developed as follows:

A. Emulsion-based concentrates (phenolics, iodophors, orthodichlorobenzene)

DATA REQUIREMENTS

( ) 1. For "General Disinfectants"

Three samples tested by the A.O.A.C. Use-Dilution Test against Salmonella choleraesuis utilizing 30 replicates per sample.

2. For Sanitizers or Detergent Sanitizers:

Three samples tested with or without hard water (depending on label claims) by the A.O.A.C. Germicidal Detergent Sanitizers Test, three determinations.

B. Pure chemicals and simple formulations (quaternary compounds with or without alcohol, hypochlorites, chlorinate isocyanurates, true pine oil disinfectants)

( ) 1. Control data derived from the first three production batches of the product based on analytical chemical and/or physical methods submitted in response to PR Notice 70-12. This data must be submitted within six months after receipt of this enclosure.

( ) 2. With quaternary-based products bearing disinfecting or hard water sanitizing claims, an analysis of the major impurities found in municipal or other water supply sources used to dilute the product must be provided. A report from the local water authority may serve to satisfy this requirement.

TENTATIVE TEST METHOD FOR LABORATORY EVALUATION OF RUG AND CARPET SANITIZERS OR BACTERIOSTATS

(Revised 4-12-71)

EQUIPMENT

1. Carpet Mounting Board - Mount a piece of 1/8 inch tempered hardboard, with tempered surface up, on a 16 x 16 inch base of 3/4 inch thick marine plywood, with 3/4 inch brads.

2. Cutting Equipment - 2 x 2 inch squares of 1/4 inch acrylic plastic as templates with 3/32 inch holes in the center and a sharp knife (1) (Beaver Office Knife with #27 or #28 replaceable blade).

3. Scrub Brushes - 1-1/4 x 3-1/2 inch surgical hand brush with 5/8 inch nylon bristles (Tomac 29721-010 (2) or equivalent $13.00 per dozen).

4. Extraction Bottles - 8 ounce, widemouth, round polypropylene bottles with screw caps (Naglene 2105 or equivalent) containing 10 stainless steel penicillin cylinders and 100 ml of appropriate neutralizer broth. (Similar style glass bottles may be used, but care to prevent breaking during shaking must be observed). For phenolic based carpet sanitizers, use AOAC nutrient broth with double strength Letheen neutralizer (AOAC Letheen Broth plus an additional 0.7 g. Lecithin and 5.0 gram Tween 80 per liter).

5. Spray Device - Adjustable spray atomizer modified to feed from a calibrated test tube or bottle. (A Model 15, DeVilviss atomizer on a 2 ounce bottle graduated with 10 mls marks).

6. Carpet - A standard type of nylon, acrylonitrile or wool pile carpeting with a fiber warp-backing. (A velvet nylon carpet with 1/4 inch deep pile on a double jute backing, Perview Pattern, Wanda Weeve Carpet was selected for collaborative testing).

   1) Rudolph Beaver Company, Belmont, Massachusetts
   2) American Hospital Supply, Evanston, Illinois

TEST CULTURES AND MEDIA

1. Test Bacteria - Staphylococcus aureus ATCC 6538 and Enterobacter aerogenes ATCC 13048.

2. Double Strength Neutralizer Broth - AOAC Letheen Broth with an additional 0.7 g Lecithin and 5.0 grams Tween 80 per liter or 0.10% sodium thioglycollate and 0.01% isooctylphenoxy polyethoxyethanol in pH 7.2 phosphate buffer.

3. Neutralizer Plant Count Agar - Standard Methods agar (Tryptone Glucose Extract Agar) to which is added 0.7 Lecithin and 5.0 grams Tween 80 per liter.

BACTERIAL INOCULUM

Prepare 8 ounce French square culture bottles with NUTRIENT AGAR B (Methods AOAC*, 4.023 (a), (2)) composed of 3 grams beef extract, 5 grams Anatone and 30 grams agar per liter. Prepare culture suspensions as per section 4.026 (Methods AOAC*). Dilute the standardized suspension in phosphate buffer dilution water (Methods AOAC*, 4.023 (F)) to obtain a stock inoculum suspension containing 10 x 10 organisms per ml.

PROCEDURE

1. Cut the carpet into 8 x 12 inch pieces and with aid of 2 x 2 inch template cut 2 rows of 3 squares per row from the backing side of the carpet having at least 4 inches between the center of each square. The test squares may be completely cut free or a preferred method is to leave about 1/8 of an inch of backing intact at each corner of each cut square so that the entire piece of carpeting can be sterilized and inoculated without separation. A mark is made with a water-proof marking pen (Carter's MARKS-A-LOT or equivalent) in the center of each test square to aid in inoculating the pile surfaces. Cover surface of carpeting with aluminum foil and fold over edges to secure. Steam sterilize and dry. Foil will serve to prevent contamination of controls during spraying. Only carpet that has been dtermined to be free of residual antimicrobials on the pile or backing surfaces following autoclaving by a zone of inhibition overlay technique should be used.

2. Prepare a standardized stock bacterial suspension by washing the 24 hour growth from NUTRIENT AGAR B bottles and adjust to a density of 10 x 109 organisms per ml with phosphate buffer. Dilute the stock suspension with phosphate buffer containing 0.01% isooctylphenoxy polyethoxyethanol to a contentration of 10 x 10 organisms per ml. Inoculate the previously marked center of each square with 0.1 ml of bacterial suspension. (Retain bacterial suspension for determination of inoculation numbers). Dry inoculated carpet in a warm incubator at 36oC for 60 minutes with the foil wrap losely in place.

   NOTE: The scrubbing procedure should be conducted in a biological hood or in a glove box. A simple safety chamber can be constructed from a large plastic bag.

* OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS' 11th Edition, 1970.

3. Condition brushes by immersing the bristles in separate containers (150 mm glass petri dishes or equivalent) or diluted test solution and a control solution without the active agent for 15 minutes. (If a control solution is not available, use sterile distilled water containing 0.01% isooctylphenoxypolyethoxyethanol). Fasten two pieces of inoculated carpet containing 12 test squares onto a mounting board by nailing each corner with upholsterer's tacks with the foil wrapping positioned so as to protect the controls during the scrubbing treatment. Place board in a safety hood.

4. Apply the portion of the predetermined amount of test solution at a temperature of 25oC uniformly to one piece of carpeting containing six spots of dried bacterial inoculum. (Liquids should be applied by a metered spray based on the amount of solution in excess of 25 ml applied by brushing based on recommended application rate per surface area. Solids may be applied by dusting). Shake excess test solution from conditioned brush and transfer to a dish containing 100 mls of test solution. Dip bristles of brush and transfer amount of retained test solution to a spot on the carpet. Scrub the spot for 30 seconds using 30 circular clockwise strokes and 30 circular counterclockwise strokes. A circular area of pile approximately 3 inches in diameter around each spot should be covered by this treatment. Moderate to heavy pressure should be applied downward on the brush to work the solution to the base of the pile. Repeat dipping of brush into test solution and scrubbing procedure until each of the six spots is treated. Allow the treated carpet to remain at room temperature for 60 minutes for partial drying of treated areas.

5. While the carpet treated with test solution is drying, spray on an amount of non-active control solution equivalent to the surface area onto 3 of the spots of dried inoculum on the control carpet. The remaining 3 spots are unscrubbed controls to determine reduction in inoculation numbers due to drying. Care should be taken not to wet or scrub over the unscrubbed control area. Scrub the 3 wet spots in the same manner as test carpet. Allow the scrubbed controls to dry 60 minutes at room conditions as for test pieces.

6. Following the 60 minute reaction period, cut each 2 x 2 test piece free with flamed forceps and knife. Transfer each 2 x 2 piece of carpeting to a separate extraction bottle of neutralizer broth. Shake each extraction bottle vigorously for a minimum of one minute to free viable organisms from the carpet fibers. Determine the number of viable organisms in each sample bottle by plating duplicate dilutions in Standard Methods Agar with appropriate neutralizer. Determine the number of viable organisms in 0.1 ml of the bacterial suspension used for inoculating the carpet. Incubate all broth extraction bottles to determine germicidal or incomplete neutralization of the test carpet.

7. Determine the percent reduction of viable organisms by the treatment method by comparing the number of surviving organisms of the treated sample against the average viable count of the scrubbed control sample. A count of 1.0 x 106 organisms per ml from the extracted unscrubbed control spots is necessary for a valid test.

If you intend to employ this test to derive data to support the registration of a carpet sanitizer, the following protocols must be considered:

1. Three (3) product samples representing three separate preparations must be tested against each of the two bacteria specified in the method with two different types of carpet. At 99.9% reduction of test bacteria over the control count must be demonstrated in each case. If the product is intended for use on commercial-grade carpeting, two representative carpets such as "Acrylic" and "polypropylene" tufted-loop type may be tested. No carpeting is available to serve as a standard. If the product is intended for use on wool carpeting, an additional representative sample must be tested. If not, the label must bear a disclaimer for such use. All carpet samples tested must be fully identified, and the pile fiber type, pile yarn weight of finished carpet, pile density and tuft height reported. Adequate controls must demonstrate that bacteriostatic agents in the carpet pile or backing do not interfere with the test results.

2. One (1) sample preparation representing a 60-day shelf-life stability study must be tested with one (1) carpet sample and one (1) test bacterium.

The amount of sanitizer applied to a piece of carpet must be extrapolated to gallons of diluted shampoo to square feet of carpet and this must be declared on the proposed label. We would expect this to be 12 gallons of dilute product to 800 to 1200 square feet of carpet. If the application is intended for hospitals, a wet vacuum pickup must be specified in the label directions. In no case will the co-called "dry shampoo treatment" be considered for hospital use.

Technical questions concerning the method may be addressed to: Dr. D.F. Garvin, BASF Wyandotte Corporation, Wyandotte, Michigan 48192. Dr. Garvin may also be reached by phone: 313-282-3300.

SPECIAL DIRECTIONS FOR CRESYLIC ACID AND SYNTHETIC PHENOLS

(For Use as Farm Premise Disinfectants)

1. Do not use in milking stalls, milking parlors or milk houses.

2. Remove all animals and feeds from premises, cars, boats, trucks, and other equipment.

3. Remove all litter and manure from floors, walls, and surfaces of barns, pens, stalls, chutes, and other facilities and fixtures occupied or traversed by animals.

4. Empty all troughs, racks, and other feeding and watering appliances.

5. Saturate all surfaces with accepted disinfecting solution.

6. Immerse all halters, ropes and other types of equipment used in handling and restraining animals as well as forks, shovels, and scrapers.

7. Ventilate buildings, cars, boats, and other closed spaces. Do not house livestock or employ equipment until treatment has been absorbed, set or dried.

8. All treated feed racks, mangers, troughs, automatic feeders, fountains and waterers must be thoroughly scrubbed with detergents and rinsed with potable water prior to reuse.

Efficacy Data Requirements for Sterilizing Claims

Employ the Association of Official Analytical Chemists' Sporicidal Test (A.O.A.C. Official Methods of Analysis, 11th Edition, Chapter 4, pp. 64-65, 1970) using:

(a) Three samples representing three different preparations using both types of carriers (porcelain penicylinders and surgical silk suture loops) and both test organisms (Bacillus subtilis and Clostridium sporogenes). Thirty replicates are required with each organism on each type of carrier. (Total of 120 replicates or carriers for each sample).

(b) Duplicate samples of one preparation representing a 60-day shelf-life stability study using 30 replicates with both test organisms named above on both types of carriers. (Total of 120 replicates or carriers for each sample).

The total number of tubes required in a single test using (a) and (b) above is 600. For the sterilizing claim, no failure in any replicate is permitted.

Methods for Evaluating the Virucidal Activity of Disinfectants

No specific official standardized method for evaluation the virucidal activity of disinfectants has been established at the present time. Until an official method has been adopted, the Division will accept adequate data developed by any virological technique which is recognized as technically sound. The procedure employed must stimulate actual in-use conditions. For this reason, acceptable virological data are usually developed by carrier methods which are modifications of either the A.O.A.C. Use-Dilution Method (for liquid surface disinfectants), or the A.O.A.C. Germicidal Spray Test (for spray surface disinfectants). In order to simulate in-use conditions, the specific virus to be tested must be inoculated onto hard surfaces, allowed to dry, and then treated with the product according to the directions for use on the product label. The treated surfaces must be assayed after ten-minutes exposure to determine if the virus has been inactivated. Since most germicidal chemicals are inherently toxic for the host systems employed in virological techniques (especially cell cultures), either a "detoxification" procedure which will render the treated virus free of residual germicide, or a virus concentration of sufficient titer to demonstrate at least a three-log reduction even when cytotoxicity is observed in tissue culture systems must be employed in the study.

The following information must be provided on each test:

1. The dilutions employed in the recovery of the virus film from the surface; e.g. 10-1, 10-2, etc.

2. Virus controls: Surfaces contaminated with the test virus; no germicide used; virus recovered at various dilutions in assay system (tissue culture, embryonated egg, mouse injection, etc.).

3. The activity of the germicide on a minimum of five separate surfaces (e.g. glass slides) contaminated with the test virus, showing recovery at various dilutions in assay system.

4. Cytotoxicity controls: Germicide on surfaces without test virus; effect on assay system.

5. The I.D.50 values calculated in the various tests.

6. The reduction of the virus titer by the activity of the germicide $I.D._{50}$/ml of the virus control less the $I.D._{50}$/ml of the test system, expressed as Log_{10} and calculated by a statistical method (Reed and Muench: Litchfield and Wilcoxan, as examples).

A typical laboratory report involving a tissue culture, therefore, would include the details of the methods employed together with a table such as follows:

Dilution of Virus from Surface	Virus-Germicide (Recovery* of Virus from Treated Surface)	Virus-Control (Recovery* of Virus from Untreated Surface)	Cytotoxicity-Control (Toxic Effect of Germicide; No Virus)
10^{-1}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-2}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-3}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-4}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-5}	T T T 0 0	+ + + + +	T T T T T
10^{-6}	0 0 0 0 0	+ + + + +	0 0 0 0 0
10^{-7}	0 0 0 0 0	+ + + + +	0 0 0 0 0
10^{-8}	0 0 0 0 0	+ + + + +	0 0 0 0 0
10^{-9}	0 0 0 0 0	+ 0 0 0 0	0 0 0 0 0

*Demonstrated by cytopathogenic effect, flourescent antibody, plaque count, animal response, or other recognized acceptable technique

Note: T - Toxic, + - Virus recovered, 0 - No virus recovered

Claims of virucidal activity for a product must be restricted to those viruses which have actually been tested. Duplicate studies on one sample are required for each virus tested. When cytotoxicity is evident (as in above table) at least a 3-log reduction in titer must be demonstrated. The virucide must demonstrate complete inactivation of the virus at all dilutions.

Where the test virus does not demonstrate measurable cytopathogenic reactions in subculture growth systems, in vitro testing would be considered presumptive. In this case, confirmatory testing in vivo must be carried out in a susceptible host after exposure of the virus to the disinfectant.

TENTATIVE RESIDUAL (SELF-SANITIZING) METHOD

To substantiate residual self-sanitizing claims for a product, the applicant must submit data prior to registration to show that the product when used as directed will substantially reduce the numbers of test microorganisms on treated representative surfaces when compared to the numbers of microorganisms on control surfaces which have been treated with the same product without the active ingredient incorporated. The following protocol may be utilized:

Three product samples representing three different preparations must be tested against each test bacterium on at least five replicates of each representative surface for which the product is intended for use. In addition, one sample preparation representing a 60-day shelf-life stability study must be tested in duplicate using one test bacterium on at least five replicates of each representative surface to be treated. The test microorganisms may be: Staphylococcus aureus ATCC 6538 and Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352. Enterobacter aerogenes ATCC 13048 may be substituted for K. pneumoniae. Representative test surfaces may include, but are not limited to glass, metal, unglazed or glazed ceramic tile, vitreous china, or wooden flooring depending on the uses proposed on the labels. The propagation of cultures and the use of subculture media and other related equipment should be as specified in sections 4.001 and 4.002 of the current A.O.A.C. Manual of Methods.

Apply the product to the control and test surfaces as directed on the label, allowing for complete drying on the surfaces. Determine the count of bacteria in a 48-hour broth culture and add a 0.01 to 0.03 ml quantity of the broth culture by spreading on 1 X 1 inch squares of each test surface using a bacteriological loop. The squares should be dried for 20 to 30 minutes in a bacteriological incubator at 30 to 37 C. A "zero time" bacterial numbers recovery test must be performed to show the efficiency of the recovery process and must be reported. The "zero time" test should show the loss in viability that occurred during the drying. A minimum count of 1 X 106 organisms per test surface must be recovered after drying for the test to be considered valid.

After a suitable time interval recover test organisms by washing the squares with adequate agitation in appropriate media or diluting fluid containing appropriate nutrient agar containing the same neutralizers by the pour or spread plate technique. Exposure time intervals between zero time, thirty minutes, one hour, three hours and six hours should be tested and reported for each surface treated with the product, as well as for each of the controls.

The results must show a bacterial reduction of at least 99.9% over the parallel control count within three hours to demonstrate any practical value.

References

AATCC Test Method 90-1965. Antibacterial activity of fabrics, detection of: agar plate method, in AATCC Technical Manual, 1968 Ed., published by American Association of Textile Chemists and Colorists, P.O. Box 12215, Research Triangle Park, North Carolina 27709.

AATCC Test Method 100-1965. Antibacterial finishes on fabrics, evaluation of, in AATCC Technical Manual, 1968 Ed., published by American Association of Textile Chemists and Colorists, P.O. Box 12215, Research Triangle Park, North Carolina 27709.

ASTM Test Method D-2574-67T. Test for resistance of emulsion paints in the container to attack by microorganisms. Am. Soc. for Testing and Materials, 1916 Race Street, Philadelphia, Pennsylvania 19103.

Biological analysis of subsurface injection waters, API recommended practice for, API-RP-38, Second Edition. Dec. 1965. American Petroleum Institute, Div. of Production, 300 Corrigan Tower Bldg., Dallas, Texas 75201.

British Standards Institution 1956 British standard technique for the preliminary assessment of aerial bactericides. B.S. 2796, 14 pp. British Standards House, 2 Park Street, London, W. 1.

Litchfield, J. T., Jr., and F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 96: 99-113.

McGray, R. J. 1970. A test method for the evaluation of air sanitization. Proc. Chem. Specialties Manufact. Assn., 106-111.

Official Methods of Analysis. Chapter 4 - Disinfectants, pp. 59 - 72, Eleventh Ed., 1970 and Supplements in 1971 and 1972; published by the Association of Official Analytical Chemists, Inc., P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington, D. C. 20014.

Petrocci, A. N. and Clarke, Paul. 1969. Proposed test method for antimicrobial laundry additives. Journal of the AOAC. 52, 836 - 842.

Proposed procedures for the screening of microbial inhibitors in hydrocarbon/water systems. Publication, Number 2, July 1966, Society for Industrial Microbiology, 3900 Wisconsin Ave., N.W., Washington, D.C. 20016.

Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. Amer. Jour. Hyg. 27: 293-497.

Stuart, L. S. 1969. Testing sterilizers, disinfectants, sanitizers and bacteriostats. Soap and Chem. Specialties. 45, 79 - 80 and 84 - 85.

Stuart, L. S. and Friedl, J. L. 1955. Testing aerosol products for germicidal and sanitizing activity. Proc. Chem. Specialties Manufact. Assn., 93 - 97.

Agriculture Canada

le 31 octobre 1980 T-1-215

FOOD PRODUCTION AND INSPECTION BRANCH

DIRECTION GÉNÉRALE, PRODUCTION ET INSPECTION DES ALIMENTS

SECTION PESTICIDES

CIRCULAIRE A LA PROFESSION

OBJET: Données sur l'efficacité des produits antimicrobiens

L'objet de cette circulaire est d'informer les titulaires faisant une demande d'homologation pour un produit antimicrobien des données qu'il devra fournir sur l'efficacité de ce dernier. Au chapitre des nouveaux principes actifs, il est prié de consulter la circulaire T-1-223 de même que les directives concernant l'homologation.

A l'article 4 de la Loi sur les produits antiparasitaires, il est spécifié que les produits antimicrobiens importés ou vendus au Canada doivent être homologués sauf exemption (aux conditions prévues à l'article 3 du Règlement d'application de la Loi et dans la circulaire à la profession T-1-214).

Aux termes de la Loi, un produit antimicrobien est défini comme tout produit utilisé dans la lutte contre les bactéries, les champignons, les virus et autres microbes à l'intérieur ou sur des objets inanimés et dans le milieu, à l'exception des aliments de l'homme et des animaux. Ce terme comprend les sous-groupes suivants:

1. les désinfectants (stérilisants, germicides, bactéricides, sporicides, fongicides, virucides, etc.)

2. les assainisseurs

3. produits de lutte pour le contrôle des micro-organismes dans l'eau industrielle

4. les agents microbiostatiques

Lorsque les étiquettes des produits en question sont soumises à l'approbation du ministère, conformément aux directives d'homologation générales sur les produits antiparasitaires, leurs allégations doivent être appuyées par des données pertinentes comme le prescrivent les directives ci-jointes sur l'homologation des produits antimicrobiens.

La présentation pour chaque produit des informations ci-dessus hâtera le processus d'approbation de l'étiquette et permettra éventuellement de réunir les données complémentaires nécessaires.

Tous ces renséigneménts doivent être envoyés en quatre exemplaires brochés a l'adresse suivante:

Section des pesticides
Division des produits végétaux et
de la quarantaine des plantes
Agriculture du Canada
Ottawa (Ontario)
K1A 0C6

S.W. Ormrod
Directeur associé (Pesticides)
Division des produits végétaux et
de la quarantaine des plantes

La présente remplace les circulaires R-1-53 datée du 17 juin 1974, et T-1-215 datée du 14 février 1980.

Distribution: PPD-2; PCP-1,2,3,4,5,8,10,12

DIRECTIVES CONCERNANT L'ENREGISTREMENT DES PRODUITS ANTIMICROBIENS

Les présentes directives concernant principalement les données d'efficacité exigées à l'appui des allégations faites dans l'étiquetage. De plus, on y trouvera copie de feuillets d'information diffusés auprès des demandeurs par l'Environmental Protection Agency (américain) et une bibliographie choisie concernant l'essai de ces produits.

Des modifications peuvent être apportées à ces directives. Nous faisons des efforts constants en vue d'améliorer nos méthodes et d'en créer de nouvelles, et d'intéresser un plus grand nombre de personnes et d'entreprises au programme de mise au point de méthodes d'essai permettant d'évaluer adéquatement l'efficacité des produits. Le demandeur doit s'assurer que la méthode d'essai choisie pour mesurer l'efficacité d'un produit est courante et applicable au produit soumis à l'homologation. On trouvera au tableau I la correspondance des codes des essais cités dans les présentes.

Les données d'efficacité exigées pour l'homologation ont pour but:

1. de fournir une preuve que le demandeur peut reproduire la composition du produit de façon qu'il ait la même activité;

2. une preuve que le produit mis en vente aura une durée de conservation raisonnable à l'étalage.

3. d'assurer un contrôle suffisant du produit de façon que les faiblesses que l'on pourra découvrir par la suite dans la Division des services de laboratoire ne pourront être imputées à des variations de contrôle, qui peuvent exister entre les différents laboratoires.

Dans les exigences énoncés ci-dessous, "préparations" désigne des préparations du produit faites individuellement, soit au laboratoire, soit par le fabricant.

Données exigées

Allégations minimales concernant le pouvoir désinfectant

Les allégations minimales doivent être appuyées de données d'efficacité obtenues soit par la méthode de dilution d'emploi de l'AOAC (Association des chimistes analystes officiels) (produits liquides) ou par la méthode d'essai des bouillies germicides sous pression de l'AOAC (bouillies sous pression). Les exigences sont de 60 répétitions pour chacun des 3 échantillons de 3 préparations différentes contre Salmonella choleraesuis. On doit aussi faire 30 répétitions de 2 échantillons de l'une des préparations, vieille aux fins d'une épreuve de stabilité après 60 jours, contre S. choleraesuis. Voir l'essai D-01.010R-70 - Méthode de dilution d'emploi, et l'essai D-01.060R-70 - Méthode d'essai des bouillies germicides sous pression.

Allégations générales concernant le pouvoir désinfectant

Les allégations générales ont une portée beaucoup plus vaste que les allégations minimales et doivent être appuyées, en plus des données d'efficacité exigées pour les allégations minimales, de données d'efficacité contre 2 autres pathogenes. On exige 60 répétitions pour chacun des 3 échantillons de 3 préparations différentes contre S. choleraesuis. De plus, on

exige 30 répétitions de chacun des 3 échantillons contre Staphylococcus aureus et un autre pathogene, à l'exclusion de S. aureus et S. choleraesuis. On doit aussi faire 30 répétitions de 2 échantillons de l'une des préparations, vieillie aux fins d'une épreuve de stabilité après 60 jours, entre S. choleraesuis. Voir l'essai D-01.010R-70 - Méthode de dilution d'emploi, et l'essai D-01.060R-70 Méthode d'essai des bouillies germicides sous pression.

Allégation concernant le coefficient de phénol.

Toute allégation concernant le coefficient de phénol doit être contrôlée, par la méthode du coefficient de phénol de l'ADAC, sur deux échantillons d'une préparation contre Salmonella typhosa. Si l'on allègue un coefficient de phénol contre toute autre bactérie, il faut aussi faire l'essai pour chacune des bactéries spécifiées. Voir l'essai D-01.020R-70 Méthode du coefficient de phénol.

Allégations contre les champignons pathogènes

Les allégations contre des champignons pathogenes spécifiques doivent être appuyées de données d'efficacité provenant de 2 échantillons d'une préparation. Voir essai D-01.030R-70 - Essai tes fongicides de l'AOAC.

Allégations contre Mycobacterium tuberculosis

Les allégations contre M. tuberculosis doivent être appuyées de données d'efficacité obtenues par la méthode de détermination de l'activité tuberculocide de l'ADAC (essai D-01.040R-70) en utilisant le milieu de culture, les micro-organismes etc., décrits dans la méthode de détermination de l'activité tuberculocite de l'AOAC.

Allégations concernant le pouvoir désinfectant contre d'autres micro-organismes

Les allégations d'efficacité contre des micro-organismes spécifiques autres que ceux qui sont nommés dans la méthode de dilution d'emploi de l'AOAC (essai D01.010R-70) ou la méthode d'essai des bouillies germicides sous pression de l'AOAC (essai D-01.060R-70) ne peuvent être acceptée que si elles sont appuyées de données d'efficacité provenant de 10 répétitions d'une préparation contre chacun des micro-organismes spécifiés.

Allégations concernant le pouvoir sporicide

Toutes les allégations concernant le pouvoir sporicide doivent être appuyées de données d efficacité obtenues par la méthode d'essai des sporicides de l'ADAC (essai D-04.010R-70). L'essai exige 30 répétitions sur chacun de deux types de porteurs (pénicylindres de porcelaine et boucles de sole pour sutures chirurgicales), contre les spores de Bacillus subtilis et de Clostridium sporogenes, sur 3 préparations différentes (120 porteurs sur chaque préparation). On doit aussi faire 30 répétitions sur chacun des deux types de porteurs contre les spores de chacun des micro-organismes, sur deux échantillons d'une des 3 préparations, vieillie aux fins d'une épreuve de stabilité après 60 jours (120 porteurs pour l'épreuve de stabilité). Les allégations additionnelles d'efficacité contre des micro-organismes sporifères autres que B. subtilis et C. sporogenes doivent être appuyées de données obtenues de 10 répétitions d'une préparation (pénicylindres de procelaine).

Allégations concernant le pouvoir stérilisant

L'essai des sporicides de l'AOAC (essai D-05.010R-70 et feuillet DIS-12) sert de base à l'appui tes allégations concernant le pouvoir stérilisant. Comme "stérilisant" (qui détruit toute vie) est un terme absolu, les données exigées à l'appui tes allégations concernant le pouvoir stérilisant sont plus strictes que pour le pouvoir sporicide. Les données de base (360 porteurs) exigées pour les allégations concernant le pouvoir sporicide, à l'exception de l'essai de stabilité après 60 jours d'étalage, sont aussi exigées pour les allégations concernant le pouvoir stérilisant. De plus, on toit faire 30 répétitions sur chaque type de porteurs contre les spores de B. subtilis et de C. sporogenes sur 2 échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours (240 porteurs, plus 360, soit 600 porteurs). Aucune croissance ne doit être observée sur aucune sous-culture ni aucun repiquage des 600 porteurs.

Allégations concernant le pouvoir virucide

En ce qui a trait aux allégations concernant le pouvoir virucide, le demandeur doit se reporter au feuillet DIS-13, intitulé "Méthodes d'évaluation de l'activite virucide des désinfectants" (essai D-06-0105-72).

Assainisseurs

Les allégations concernant le pouvoir assainissant tes iodophores, des halogénures mélangés et des produits chimiques chlorés doivent être appuyées de données d'efficacité obtenues par la méthode de détermination de la concentration équivalente de chlore actif germicide (essai D-03-020R-70). On exige un essai sur 3 échantillons de 3 préparations indiquant les concentrations du produit ayant une activité équivalente aux étalons de 50, 100 et 200 ppm de chlore actif sous forme d'hypochlorite de sodium contre S. typhosa. On toit aussi fournir les données de 2 échantillons et de l'une de ces préparations, vieillie aux fins de l'essai après 60 jours d'étalage, indiquant les concentrations du produit ayant une activité équivalente aux 3 étalons. Les analyses chimiques peuvent être remplacées par tes essais biologiques sur l'échantillon de 60 jours.

Les allégations concernant le pouvoir assinissant des composés d'amonium quaternaire et les préparations à base de phosphate trisodique chloré et d'acide-détergent anionique doivent être appuyées de données d'efficacité obtenues par la méthode d'essai des assainisseurs germicides et détergents (essai D-03.010R-70). On exige un essai sur chacune de 3 préparations différentes contre E. coli et S. aureus, de même que sur 2 échantillons de l'une de ces préparations, vieille aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours, contre E. coli. Dans le cas d'allégations d'efficacité du produit dans l'eau dure, on exige un essai sur 2 échantillons d'une préparation contre E. coli et S. aureus pour la tolérance à l'eau dure alléguée.

Pour l'essai d'efficacité des assainisseurs détergents, il peut être nécessaire de modifier les essais normalisés de l'AOAC afin d'y inclure des neutralisants appropriés, non spécifiés dans les méthodes. Par exemple, pour l'essai du phosphate trisodique chloré, il faut neutraliser le chlore résiduel avec du thiosulfate de sodium.

Additifs de blanchissage

Les allégations concernant le pouvoir bactériostatique persistant des additifs de blanchissage doivent être appuyées de données d'efficacité obtenues par la méthode de détermination de l'activité bactériostatique des additifs de blanchissage de l'AOAC (essai D-02.010R-72). On doit faire l'essai de 3 échantillons de 3 préparations avec 5 carrés de tissu traité d'un pouce de côté, contre S. aureus et Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352, sur gélose ensemencée, pour chaque échantillon. On doit faire l'essai de 2 échantillons d'une préparation vieille de 60 jours avec 5 carrés de tissu, sur gélose ensemencée, avec S. aureus.

Pour les produits portant des allégations concernant le pouvoir assainissant, la méthode de Petrocci et Clarke peut être employée pour obtenir les données d'efficacité à l'appui de l'homologation (essai D-03.070T-69), car il n'existe aucune méthode officielle. Les essais peuvent être faits au moyen d'une machine à laver plutôt que suivant la méthode de Petrocci et Clarke. Les organismes soumis à l'essai sont K. pneumoniae, ATCC 4352 et S. aureus, ATCC 6558. Les protocoles généraux, la multiplication des cultures, les rapports tissu/eau, les tisses soumis à l'essai, les températures de l'eau et les milieux de sous-culture doivent être conformes à l'essai D-03.070T-69. Les essais doivent porter sur 3 carrés de tissus sur chacun des 3 échantillons de 3 préparations contre les 2 bactéries spécifiées. Un échantillon vieux de 60 jours toit être essayé en double contre S. aureus. Le nombre de bactéries doit avoir diminué de 99.9%, par rapport aux numérations témoins, au cours des 10 minutes qui suivent.

Pour les allégations concernant le pouvoir désinfectant, la méthode de Petrocci et Clarke est employée (essai D-03.070T-69); toutefois, les essais sont faits avec 30 carrés de tissus sur chacun des 3 échantillons de 3 préparations contre les 2 bactéries spécifiées. Un échantillon vieux de 60 jours doit être soumis à l'essai en double sur 15 carrés de tissu contre S. aureus. La méthode doit être modifiée de façon à comporter l'essai du tissu et de l'eau de lavage (5 ml d'une machine à laver automatique ou 0.5 ml du contenant de l'appareillage d'essai) dans des pots à large col contenant du substrat de sous culture et des neutralisants. Le rapport de l'eau de lavage ajoutée au volume de substrat ne doit pas excéder 1:40. On note la présence ou l'absence de croissance après 48 heures d'incubation.

Les données exigées énoncées ci-dessus pour les additifs de blanchissagene s'appliquent pas aux hypochlorites de sodium et de calcium, aux dichloro-s-triazinetrione de sodium et de potassium, ni à la trichloros-triazinetrione.

Conservateurs pour textiles

Les méthodes prescrites par l'American Association of Textile Colorists and Chemists sur gélose en boîte de Pétri (essai D-02.020S-65) ou milieu de culture liquide (essai D-02.030S-65) peuvent servir pour appuyer les allégations concernant le pouvoir bactériostatique persistant.

Assainisseurs d'air

Aucune méthode normalisée d'évaluation des allégations concernant les assainisseurs d'air n'a été adoptée. Des rapports de Stuart et Friedl, de McGray et de la British Stantarts Institution décrivent des méthodes d'essai des aérosols destinés à assainir temporairement les lieux clos. Plusieurs chercheurs ont montré que l'addition de glycols (triéthylène, propylène et dipropylène glycol) aux préparations sous pression, à des concentrations de 5 à 10%, provoque une diminution significative de la chargé de bactéries dans l'air si l'on atteint des concentrations con venables de vapeurs. Actuellement, comme il n'existe aucune méthode d'évaluation de ces produits, les exigences, en ce qui concerne l'efficacité aux fins de l'homologation, sont satisfaites par les résultats d'analyses chimiques indiquant des concentrations suffisantes de glycols. Les assainisseurs d'air qui ne contiennent pas ces concentrations de glycols doivent être évalués dans une pièce et démontrer leur efficacité à réduire significativement le nombre de micro-organismes présents dans l'air. Le principal organisme soumis à l'essai est S. aureus. Suivant l'usage prévu du produit, d'autres organismes, comme Salmonella ou Pseudomonas peuvent aussi être utilisés.

Assainisseurs pour tapi

Il n'existe aucune méthode officielle définitive pour l'essai d'efficacité des assainisseurs pour tapis; toutefois, une méthode expérimentale a été mise au point grâce aux efforts de l'AOAC et est décrite plus loin (essai D-03.040T-71). Si l'on utilise cette méthode pour obtenir des données à l'appui de l'homologation d'un assainisseur pour tapis, les protocoles suivants doivent être adoptés:

a. L'essai doit porter sur 3 échantillons de 3 préparations différentes contre chacune des 2 bactéries spécifiées dans la méthode et sur 2 types différents de tapis. Dans chaque cas, le nombre de bactéries doit être abaissé de 99.9% par rapport aux numérations témoins. Si le produit est destiné à l'entretien des tapis, 2 tapis représentatifs, p. ex. de type tufté en fibre acrylique ou de polypropylène, peuvent être soumis à l'essai. Aucun tapis ne peut servir de norme. Si le produit est destiné aux tapis de laine, un échantillon représentatif additionnel doit être soumis à l'essai. Sinon, une indication à l'effet contraire toit figurer sur l'étiquette. Tous les échantillons de tapis soumis à l'essai doivent être bien identifiés, et l'on doit indiquer le type de fibre, le poids des fibres, la densité des poils et la hauteur des boucles. Des essais témoins doivent démontrer que des agents bactériostatiques présents dans les poils ou le canevas tu tapis n'interviennent pas dans les résultats de l'essai.
b. Une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours toit être soumise à l'essai sur un échantillon de tapis et contre une bactérie.

La quantité d'assainisseur appliqué sur une pièce de tapis doit être déclarée sur l'étiquette proposée. La quantité devrait être de 12 gallons de produit dilué pour 800 à 1,200 pi^2 de tapis.

Piscines

Les allégations concernant les désinfectants d'eau de piscine doivent être appuyées de données d'efficacité obtenues par la méthode d'essai des désinfectants d'eau de piscine de l'AOAC (essai D-01.050R-70). On exige un essai sur 3 préparations différentes contre E. coli et Streptococcus faecalis. On doit aussi fournir les resultats de l'essai de 2 échantillons d'une préparation vieille de 60 jours contre E. coli.

Les exigences ci-dessus concernant les désinfectants d'eau de piscine ne s'appliquent pas aux préparations simples d'hypochlorites de sodium et de calcium, de dichloro-s-triazinetrlone de sodium et de potassium ni de trichloro-s-triazinetrione, si l'étiquette de ces produits porte un mode d'emploi suffisant pour la désinfection de l'eau des piscines.

Produits divers

Des méthodes appropriées ont été mises au point pour évaluer l'efficacité de quelques produits qui n'entrent pas logiquement dans les catégories ci-dessus. On trouvera dans cette catégorie des méthodes d'essai de produits antimicrobiens déstines à empêcher la détérioration des peintures ou la contamination des canalisations d'eau et d'hydrocarbures dans l'industrie pétrolière. Ces méthodes sont décrites dans les publications de l'American Society for Testing and Materials (ASTM), de l'American Petroleum Institute ou de la Society for Industrial Microbiology. On trouvera dans la bibliographie les méthodes publiées.

Essais d'efficacité

On trouvera au tableau I la liste des essais utilisés pour appuyer les allégations concernant divers produits désinfectants. Les numéros de code indiquent la catégorie génerale des produits dont il est question dans les présentes directives ("D" désignant les désinfectants), le produit spécifique (01. = désinfectants; 02. = bactériostatiques; 03. assainisseurs; 04.= sporicides; 05. = stérilisants; 06. = virucides; 07. = divers), la catégorie de l'essai (R = essai requis, officiel; T = essai expérimental, généralement à l'étude en collaboration; S = essai suggéré, non officiel dont le stade de mise au point n'exige pas encore un examen en collaboration), et l'année (65, 69,70, etc.), indiquant la date la plus récente associée à la mise au point de l'essai.

Une bibliographie complète des essais publiés et mentionnés dans les présentes est présentée à la fin des directives. On trouvera aussi à la fin du présent document des essais expérimentaux ou suggérés, généralement publiés sous forme de feuillets de normalisation par les microbiologistes de la Division de réglementation des antiparasitaires de l'Environmental Protection Agency.

TABLEAU 1. Méthodes d'évaluation de l'efficacité des produits désinfectants

N° de code	Produit ou allégation	Méthode
D-01.000	Désinfectants	
D-01.010R-70	Allégations minimales concernant le pouvoir désinfectant	Dilution d'emploi de l'AOAC
D-01.010R-70	Allégations générales concernant le pouvoir désinfectant	Dilution d'emploi de l'AOAC
D-01.020R-70	Allégations sur le coefficient de phénol	Coefficient de phénol de l'AOAC
D-01.030R-70	Allégations contre les champignons pathogènes	Essai des fongicides de l'AOAC
D-01.040R-70	Allégations contre M. tuberculosis	Détermination de l'activité tuberculocide de l'AOAC
D-01.010R-70	Allégations concernant d'autres micro-organismes	Dilution d'emploi de l'AOAC
D-01.050R-70	Piscines	Essai des désinfectants d'eau de piscine de l'AOAC
D-01.060R-70	Produits en bouillie sous pression	Essai des bouillies germicides sous pression de l'AOAC
D-01.070T-69	Blanchissage-eau de lavage et tissu	Petrocci et Clarke
D-02.000	Bactériostatiques	
D-02.010R-72	Blanchissage	Détermination de l'activité bactériostatique des additifs de blanchissage
D-02.020S-65	Tissus	Essai 90-1965 de l'AATCC
D-02.030S-65	Tissus	Essai 100-1965 de l'AATCC
D-03.000	Assainisseurs	
D-63.010R-70	Préparations à base d'ammonium quaternaire ou d'acide et détergent	Essai tes assainisseurs germici des et détergents de l'AOAC
D-03.020R-70	Iodophores et produits à base de chlore et d'halogénures mélangés	Détermination de la concentra tion équivalente dechloreactif
D-03.010R-70	Allégations concernant l'eau dure	Essai des assainisseurs germici des et détergents de l'AOAC
D-03.030	Assainisseurs d'air	Simulation d'emploi
D-03.040T-71	Tapis	Feuillet DIS-15
D-03.050T-71	Surfaces non en contact avec des aliments	Feuillet DIS-5
D-03.060T-72	Pour résidues sur surfaces dures	Feuillet DIS-14
D-03.070T-69	Blanchissage eau de lavage et tissus	Petrocci et Clarke

TABLEAU 1 (suite) Méthodes d'évaluation de l'efficacité des produits désinfectants

N° de code	Produit ou allégation	Méthode
D-04.000	Sporicides	
D-04.010R-70	Produits sporicides	Essai des sporicides de l'AOAC
D-05.000	Stérilisants	
D-05.010R-70	Stérilisants chimiques.	Essai des sporicides de l'AOAC et Feuillet DIS-12
D-06.000	Virucides	Feuillet DIS-13
D-07.000	Divers	
D-07.010R	Additifs pour eau d'injection dans les puits de pétrole	Institut américain du pétrole
D-07.020T-67	Conservateurs incorporés aux peintures	Essai D-2574-67T de l'ASTM
D-07.030S-66	Additifs antimicrobiens pour produits pétroliers	Méthode proposée par la Society for Industrial Microbiology

Feuillets de normalisation

Divers feuillets de normalisation ont été publiés par l'Environment Protection Agency à l'intention des demandeurs. Ces feuillets sont reproduits dans les pages qui suivent; en voici la liste des titres et des numéros:

Titre	N° de code
Données d'efficacité exigées	DIS-1
Données d'efficacité exigées	DIS-2
Données d'efficacité exigées	DIS-3
Indications spéciales d'emploi des désinfectants pour poulaillers	DIS-4
Essai des assainisseurs (pour les objets inanimés non en contact avec des aliments)	DIS-5
Bactériostatiques, assainisseurs et désinfectants employés en blanchisserie	DIS-6
Préparations reproduisant un produit pour lequel le fabricant a fourni des données	DIS-7
Préparations identiques à des produits homologués	DIS-8
Préparations obtenues par simple dilution dans l'eau de concentrés homologués	DIS-9
Méthode expérimentale d'évaluation en laboratoire d'assainisseurs et de bactériostatiques pour tapis	DIS-10
Directives spéciales concernant les produits à base d'acide crésylique et de phénols synthétiques (employés comme désinfectants de locaux agricoles et classés pour emploi non alimentaire)	DIS-11
Données d'efficacité exigées pour les allégations concernant le pouvoir stérilisant	DIS-12
Méthodes d'évaluation de l'activité virucide des désinfectants	DIS-13
Méthode expérimentale d'essai des produits assainisseurs persistants	DIS-14

Données d'efficacité exigées - I

A. Pour les désinfectants (Allégations minimales ou générales):

Méthode de dilution d'emploi de l'AOAC; ( ) méthode d'essai des bouillies germicides de l'AOAC.

Soixante répétitions de chacun des trois échantillons de trois préparations différentes contre:
( ) Staphylococcus aureus, ( ) Salmonella choleraesuis

Trente répétitions de chacun des trois échantillons de trois préparations différentes contre:
( ) Staphylococcus aureus, ( ) Salmonella choleraesuis, ( ) Pseudomonas aeruginosa, ( ) Trichophyton interdigitale, ( ) Un agent pathogène (à l'exclusion de S. aureus et S. choleraesuis).

Trente répétitions de chacun des deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours contre:
( ) S. aureus, ( ) S. choleraesuis.

Dix répétitions d'un échantillon contre chacun des autres agents pathogènes allégués.

B. Coefficient de phénol:

Essais du coefficient de phénol de l'AOAC, en double, sur un échantillon d'une préparation contre: ( ) Salmonella typhosa, ( ) S. aureus, ( ) tous les autres agents pathogènes allégués.

C. Essais des fongicides, tuberculocides ou virucides:

Essais des fongicides de l'AOAC sur deux échantillons d'une préparation.

Essais des tuberculocides de l'AOAC sur une préparation (un échantillon).

Essais modifiés des tuberculocides de l'AOAC conformément à la méthode d'essai des bouilles germicides sous pression de l'AOAC, sur une préparation (un échantillon). Techniques virologiques acceptables. Un échantillon répété en double contre tous les virus spécifiés sur l'étiquette.

NOTA: Si l'on substitue par d'autres les micro-organismes spécifiés dans les méthodes mentionnées ci-dessus, le milieu de culture, le temps d'incubation et tous les autres facteurs devront être évalués en fonction de la valeur des résultats allégués.

Référence: AOAC Official Methods of Analysis, 11e édition, chapitre 4 - Désinfectants, page 59 - 74, 1970.

Données d'efficacité exigées - II

D. Essais sur gélose ensemencée. Essais 90-1965 de l' MTCC, B 175-176, 1966, Manuel technique de l'American Association of Textile Chemists and Colorists, volume 40, 1968. (Modifié pour remplacer les porteurs en tissus par des porteurs appropriés, à surface dure, comme l'acier ou la céramique.)

( ) Trois échantillons représentant trois préparations différentes du produit. Cinq échantillons d'un pouce carré de tissus ou de tissus traités suivant le mode d'emploi du produit, avec ( ) S. aureus, ( ) E. coli.

( ) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours, au moyen de cinq échantillons d'un pouce carré contre S. aureus.

E. Essais des assainisseurs germicides et détergents de l'AOAC:

( ) Trois échantillons de trois préparations différentes contre Escherichia coli et Staphylococcus aureus.

( ) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours, contre E. coli.

NOTA: Si l'on allègue des emplois dans l'eau dure, les essais ci-dessus doivent être faits dans l'eau dure, aux tolérances alléguées, au lieu de l'eau distillée.

F. Essais de détermination de la concentration équivalente de chlore actif germicide de l'AOAC:

( ) Trois échantillons de trois préparations différentes dont les concentrations on une activité équivalente aux trois étalons de 50, 100 et 200 ppm de chlore actif sous forme d'hypochlorite de sodium, contre Salmonella typhosa.

( ) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours*, dont les concentrations ont une activité équivalente aux trois étalons.

*L'analyse chimique peut remplacer l'essai biologique dans le cas des produits organo-chlorés.

NOTA: Si l'on substitue par d'autres les micro-organismes spécifiés dans les méthodes mentionnées ci-dessus, le milieu de culture, le temps d'incubation et tous les autres facteurs devront être évalués en fonction de la valeur des résultats allégués.

Référence: AOAC Official Methods of Analysis, 11e édition, chapitre 4 - Désinfectants, page 59 à 74, 1970.

Données d'efficacité requises - III

G. Méthode d'essai des désinfectants pour eau de piscine de l'AOAC:

( ) Trois échantillons de trois préparations différentes contre Escherichia coli et Streptococcus faecalis.

( ) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours, contre Escherichia coli.

( ) Essais en piscine conformément aux normes NSF; la numération en boîtes de Pétri doit démontrer qu'au plus 15% des échantillons excèdent 200 colonies par ml, 2.2 coliformes par 100 ml, ou 2.2 entérocoques par 100 ml. (National Sanitation Foundation, P.O. Michigan 48106.)

H. Essais des sporicides de l'AOAC

( ) Essais de trois échantillons de trois préparations différentes au moyen de deux types de porteurs (pénicylindres de porcelaine et boucles de soie pour sutures chirurgicales); deux organismes à l'essai (Bacillus subtilis et Clostridium sporogenes); trente répétitions sur chaque type de porteur (120 répétitions ou porteurs).

( ) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours: 30 répétitions sur un organisme et les deux types de porteurs.

( ) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours: 30 répétitions sur les deux organismes mentionnés ci-dessus et sur les deux types de porteurs. (120 répétitions ou porteurs pour chaque échantillon.)

( ) Un échantillon d'une préparation: trente repétitions (pénicylindres de porcelaine) pour chaque organisme sporifère mentionné, autre que B. subtilis et C. sporogenes.

NOTA: Si l'on substitue d'autres micro-organismes à ceux qui sont spécifiés dans les méthodes mentionnées ci-dessus, le milieu de culture, les temps d'incubation et tous les autres facteurs devront être evalués en fonction de la valeur des résultats allégués.

Référence: AOAC Official Methods of Analysis, 11e édition, chapitre 4 - Désinfectants, page 59 à 74, 1970.

Indications spéciales concernant les désinfectants pour poulaillers

1. Enlever toutes les volailles et tous les aliments des lieux, des camions et tes cages.

2. Enlever toute la litière et tout le fumier des planchers, des murs et des surfaces ou installations occupées par des volailles.

3. Vider les auges, mangeoires et autres installations d'alimentation et d'abreuvement.

4. Saturer les surfaces de la solution recommandée.

5. Aérer les bâtiments, les cages et les autres espaces clos. Ne pas reloger les vollailes ni utiliser le matériel jusqu'à ce que la solution de traitement soit absorbée, fixée ou séchée.

6. Les mangeoires, auges, alimentateurs automatiques et abreuvoirs doivent être rincés à font à l'eau potable avant de les réutiliser.

NOTA: Les indications ci-dessus doivent figurer sur l'étiquette des produits contenant de l'acide crésylique, des phénols synthétiques, des huiles de pins ou des composés à base d'ammonium quaternaire.

ESSAI DES ASSAINISSEURS

(pour les objets inanimés qui n'entrent pas en contact avec des aliments)

Avant l'homologation, le demandeur doit fournir des données à l'appui des allégations concernant le pouvoir assainissant d'un produit démontrant que s'il est utilisé suivant le mode d'emploi, il réduira considérablement le nombre de micro-organismes soumis à l'effet sur une surface, par rapport à une autre surface témoin non traitée. On peut adopter le protocole suivant:

Les échantillons de trois préparations différentes doivent être éprouvés contre chaque bactérie de l'essai et sur chaque surface représentative. De plus, deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours doivent être éprouvés contre une bactérie. Les micro-organismes éprouvés peuvent être Staphylococcus aureus ATCC 6538 et Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352; > ATCC 13048 peut remplacer K. pneumoniae. Les surfaces représentatives soumises à l'essai peuvent comprendre, mais sans exclure toute autre surface, du verre, du métal, des carreaux de céramique vitrifiée ou non vitrifiée ou de la porcelaine vitrifiée, suivant les usages proposés sur l'étiquette. La propagation des cultures et l'emploi de substrats de sous-culture et d'autres matériels connexes doivent être conformes aux paragraphes 4.001 et 4.002 du manuel de méthodes de l'AOAC.

Déterminer le nombre de bactéries dans une culture de 18 à 24 heures, et ajouter 0.01 à 0.03 ml du bouillon de culture en l'étendant sur des carrés d'un pouce de côté de la surface soumise à l'essai au moyen d'un fil en boucle pour ensemencement. Les carrés doivent être séchés pendant 20 à 30 minutes dans un incubateur bactériologique maintenu à 30 à 37° C. On doit faire un essai de récupération des bactéries au temps zéro afin de vérifier l'efficacité de la méthode de récupération, et en indiquer les résultats. L'essai au temps zéro doit indiquer la perte de viabilité au cours du séchage. Appliquer le produit sur la surface à éprouver conformément au mode d'emploi de l'étiquette. Après un intervalle de temps convenable, récupérer les organismes soumis à l'essai en lavant les carrés en les agitant convenablement dans un milieu approprié ou dans un diluant contenant des neutralisants appropriés. Faire des numérations en boîtes de Pétri sur gélose contenant des substances nutritives appropriées et les mêmes neutralisants, par la technique de versage ou d'épendage. Les intervalles d'exposition entre les temps zéro et dix minutes doivent être vérifiés tant pour le produit que pour les témoins non traités.

Les résultats doivent démontrer une diminution du nombre de bactéries d'au moins 99.9% par rapport aux numérations témoins au cours des 5 minutes qui suivent. On doit faire l'essai de trois surfaces pour chaque micro-organisme soumis à l'essai et pour chaque échantillon, soit 9 essais pour chaque bactérie. L'essai de stabilité après 60 jours doit être fait sur deux surfaces contre une bactérie.

BACTÉRIOSTATIQUES, ASSAINISSEURS ET DÉSINFECTANTS EMPLOYÉS EN BLANCHISSERIE

Allégations concernant les bactériostatiques persistants pour tissus:

( ) Tous les essais doivent être faits suivant la méthode d'essais de l'activité bactériostatique des additifs de blanchissage de l'AOAC, décrite dans le 2e supplément de la 11e édition de Official Methods of Analysis AOAC (JAOAC, 55 (2): 400-402, 1972). L'essai doit porter sur cinq carrés de tissus d'un pouce de côté sur chacun des trois échantillons de trois préparations, contre S. aureus et Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352, sur gélose ensemencée. On doit aussi faire-l'essai de deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours au moyen de cinq carrés de tissus, sur gélose ensemencée avec S. aureus.

Allégations concernant le pouvoir assainissant ou désinfectant pour les tissus et les eaux de lavage:

Il n'existe pas de méthode officielle pour évaluer l'efficacité des produits de cette catégorie. On trouvera dans JAOAC, 52, 836-838, 1969, les protocoles d'essais d'une méthode expérimentale. La bactérie gram-négative soumise à l'essai est Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352. Les essais peuvent être faits dans une machine à laver ou dans les appareils spécifiés dans la méthode expérimentale. Les protocoles généraux, la propagation des cultures, les rapports tissus/eau, les tissus soumis à l'essai, les températures de l'eau et le substrat de sous-culture doivent être les mêmes que ceux qui sont spécifiés dans la méthode expérimentale.

( ) Allégations concernant le pouvoir assainissant: L'essai doit porter sur trois carrés de tissus sur chacun des trois échantillons de trois préparations, contre les deux bactéries spécifiées. Un échantillon vieilli de 60 jours doit être soumis à l'essai en double contre Staphylococcus aureus. L'essai doit démontrer une diminution de 99.9% du nombre de bactéries en dix minutes par rapport aux numérations témoins.

( ) Allégations concernant le pouvoir désinfectant: L'essai doit porter sur 30 carrés de tissus sur chacun des trois échantillons de trois préparations, contre les deux bactéries spécifiées. Un échantillon vieilli de 60 jours doit aussi être soumis à l'essai en double sur 15 carrés de tissus contre S. aureus. La méthode doit être modifiée de façon que l'essai porte 3 la fois sur le tissu et l'eau de lavage (5 ml d'une machine à laver automatique ou 0.5 ml du contenant de l'appareil d'essais) dans des flacons à large col contenant du substrat de sous-culture et des neutralisants. Le rapport entre les volumes d'eau de lavage ajoutés et de substrats ne doit pas excéder 1:40. On note la présence ou l'absence de croissance après 48 heures d'incubation.

Les exigences ci-dessus ne s'appliquent pas aux hypochlorites de sodium et de calcium, aux dichloro-s-triasinetriones de sodium et de potassium, ni au trichloros-triazinetrione.

PRÉPARATIONS REPRODUISANT UN PRODUIT POUR LEQUEL LE FABRICANT A FOURNI DES DONNÉES

Dans le cas d'un produit soumis à l'homologation qui reproduit une préparation homologuée mais non destinée à la vente par le fabricant, les données versées au dossier peuvent être utilisées à condition:

( ) 1. Que l'on soumette une lettre officielle d'autorisation par laquelle le fabricant permet l'accès à son dossier.

2. Que le demandeur fournisse les données d'efficacité suivantes pour son propre produit fini:

( ) A. Désinfectants d'emploi général

(1) Méthode de dilution d'emploi de l'AOAC
(2) Trente répétitions sur chacun de deux échantillons contre Salmonella choleraesuis.

( ) B. Assainisseurs utilisés pour le rinçage final de la verrerie, des ustensiles ou du matériel dans les restaurants, bars, usines laitières et établissements de fabrication d'aliments.

(1) Essais des assainisseurs germicides et détergents et de l'AOAC
(2) Un essai sur un échantillon contre Escherichia coli. L'essai doit être fait en eau dure si l'étiquette porte une allégation de tolérance en eau dure.

( ) C. Désinfectants en bouillie sous pression

(1) Certification que tous les matériaux et dispositifs constituant le contenant sont identiques à ceux qui sont spécifiés par le fabricant de base.
(2) Essai des bouillies germicides sous pression de l'AOAC
(3) Trente répétitions sur chacun de deux échantillons contre S. aureus et S. choleraesuis.

PRÉPARATIONS IDENTIQUES A DES PRODUITS HOMOLOGUÉS

Les produits soumis à l'homologation qui sont identiques à des produits déjà homologués, fabriqués et mis au marché par un premier demandeur, peuvent être acceptés à condition:

( ) 1. Que l'on soumette une lettre officielle par laquelle le premier demandeur autorise l'accès au dossier du produit homologué.

( ) 2. Qu'on soumette un document prouvant que le produit est fabriqué et (ou) dosé par le promier demandeur pour le second demandeur.

( ) 3. Si le produit destiné à l'homologation, exception faite des bouillies sous pression, est fabriqué et (ou) dosé par le demandeur, les critères établis dans le document "Préparations reproduisant un produit homologué" s'appliqueront.

( ) 4. S'il s'agit d'une bouillie sous pression, on doit prouver que tous les matériaux des dispositifs sont identiques à ceux qui sont utilisés par le premier demandeur; de plus, le fabricant du contenant doit être le même pour les deux produits. S'il est impossible d'en fournir la preuve, le demandeur doit présenter des données complètes d'efficacité de son propre produit suivant la méthode d'essai des bouillies germicides sous pression de l'AOAC.

PRÉPARATIONS OBTENUES PAR SIMPLE DILUTION DANS L'EAU DE PRODUITS CONCENTRÉS HOMOLOGUÉS

Les données de base établies par le fournisseur du concentré homologué peuvent être utilisées conformément aux directives qui suivent:

I. Le fournisseur doit envoyer une lettre autorisant la consultation de son dossier au nom du demandeur.

II. Les données suivantes, confirmant que le produit dilué peut être considéré comme efficace s'il est employé suivant le mode d'emploi, doivent être fournies:

A. Concentrés émulsionnés (phénoliques, iodophores, orthodichlorobenzène)

DONNÉES EXIGÉES

( ) 1. Désinfectants d'emploi général

Trente répétitions de trois échantillons éprouvés suivant la méthode de dilution d'emploi de l'AOAC contre Salmonella choleraesuis.

2. Assainisseurs ou assainisseurs détergents:

Trois échantillons éprouvés ou non dans l'eau dure (suivant les allégations de l'étiquette) par la méthode d'essais des assainisseurs germicides et détergents de l'AOAC.

B. Produits chimiques purs et préparations simples (composés quaternaires avec ou sans alcool, hypochlorites, isocyanurates chlorés, désinfectants à base de vraie huile de pins)

( ) 1. Données de contrôle obtenues des trois premiers lots de production, basées sur des méthodes d'analyse chimique et (ou) physique conformément à l'avis PR 70-12. Ces données doivent être présentées au cours des six mois qui suivent la réception du présent document.

( ) 2. Dans le cas des produits à base de composés quaternaires et portant des allégations concernant le pouvoir désinfectant ou le pouvoir assainissant dans l'eau dure, on doit fournir une analyse des principales impuretés trouvées dans les aqueducs ou d'autres sources d'eau employées pour diluer le produit. Un rapport du service local d'aqueduc peut suffire.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE D'ÉVALUATION EN LABORATOIRE DES ASSAINISSEURS ET DES BACTÉRIOSTATIQUES POUR TAPIS

(Revu le 4 décembre 1971)

MATÉRIEL

1. Planche de montage des tapis - Fixer un carré de carton-fibre (masonite) de 1/8 de pouce d'épaisseur, surface finie en haut, sur un carré de contre-plaqué à l'épreuve de l'eau de 16 pouces de côté et de 3/4 de pouce d'épaisseur, au moyen de clous étêtés de 3/4 de pouce.

2. Matériel de découpage - Gabarits faits de carrés de plastique acrylique de 2 pouces de côté et de 1/4 de pouce d'épaisseur, percés de trous de 3/32 de pouce, et couteau tranchant (1)(Couteau Beaver avec lame remplacable n° 27 ou 28).

3. Brosses - Brosses à main de chirurgie de 10 sur 30 pouces, avec poils de nylon de 5/8 de pouce (Tomac 29721 - 010 (2) ou l'équivalent, $13.00 la douzaine).

4. Bouteilles d'extraction - Bouteilles rondes de 8 onces, à large col, en polypropylène, avec bouchons à vis (Naglene 2105 ou l'équivalent) contenant 10 pénicylintres en acier inoxydable et 100 ml d'un bouillon neutralisant approprié. (Des bouteilles de verre de même type peuvent être employées, mais il faut prendre soin de ne pas les briser au cours de l'agitation.) Dans le cas des assainisseurs a base de phénol, employer le bouillon nutritif de l'AOAC avec une double concentration de neutralisant Letheen (bouillon Letheen de l'AOAC plus 0.7 g de Lécithine et 5 g de Tween 80 par litre).

5. Atomiseur - Atomiseur réglable modifié de façon à s'alimenter d'une éprouvette ou d'une bouteille graduée. (Atomiseur DeVilbiss modèle 15, avec bouteille de 2 onces graduée en 10 ml.)

6. Tapis - Tapis de type normalisé avec poils de nylon, d'acrylonitrile ou de laine, avec canevas à chaîne de fibres. (On a choisi, pour les essais en collaboration, un tapis à velours de nylon avec poils de 1/4 de pouce sur canevas double de jute, modèle Perview, Wanda Weeve Carpet.)

1) Rudolph Beaver Company, Belmont (Massachussetts)
2) American Hospital Supply, Evanston (Illinois)

CULTURES ET MILIEUX DE CULTURE

1. Bactéries soumises à l'essai - Staphylococcus aureus ATCC 6538 et Enterobacter aerogenes ATCC 13048.

2. Bouillon neutralisant double concentration - Bouillon Letheen de l'AOAC, plus 0.7 g de Lécithine et 5 g de Tween 80 par litre, ou thioglycollate de sodium 0.10% et isooctylphenoxy-polyéthoxyéthanol 0.01% dans un tampon au phosphate de pH 7.2 .

3. Gélose neutralisante pour numération - Gélose des méthodes standard (Gélose de Tryptone, Glucose et extrait de boeuf) à laquelle on a ajouté 0.7 g de Lécithine et 5 g de Tween 80 par litre.

INOCULUM BACTÉRIEN

Préparer des fioles à culture carrées de 8 onces en y versant de l'agar nutritif B (Méthodes de l'AOAC*, 4.023 (a), (2).), fait de 3 g d'extraits de boeuf, 5 g d'Anatone et 30 g de gélose par litre. Préparer les suspensions de cultures conformément au paragraphe 4.026 (Méthodes de l'AOAC). Diluer la suspension normalisée dans une solution diluée de tampon au phosphate (Méthodes de l'AOAC, 4.023 (f)) pour obtenir une suspension-mère d'inoculum contenant 10 x 10^9 organismes par ml.

MODE OPÉRATOIRE

1. Couper le tapis en morceaux de 8 x 12 pouces, et à l'aide du gabarit de 2 pouces de côté, découper, du côté du canevas, 2 rangées de 3 carrés de tapis par rangée, les centres de chaque carré étant espacés d'au moins 4 pouces. Les carrés de tapis soumis à l'essai peuvent être complètement détachés du tapis; la méthode préférée est de laisser environ 1/8 de pouce de canevas intact à chaque angle de chaque carré de tapis de façon que tout le morceau de tapis puisse être stérilisé et inoculé avant qu'on en détache les carrés de tapis. On fait une marque à l'encre à l'épreuve de l'eau (Marks-A-Lot de Carter ou l'équivalent) au centre de chaque carré afin de faciliter l'inoculation. Recouvrir la surface du tapis de feuilles d'aluminium repliées sous les bords. Stériliser à la vapeur et sécher. Les feuilles d'aluminium empêcheront la contamination tes témoins au cours de l'atomisation. Seul les morceaux de tapis trouvés exempts d'agents antimicrobiens persistants dans les poils ou sur le canevas après autoclavage, au moyen d'une technique de chevauchement des zones d'inhibition, doivent être employés.

2. Préparer une suspension normalisée de bactéries en lavant les bouteilles d'agar nutritif incubées pendant 24 heures et ajuster à une densité de 10 x 10^9 organismes par ml au moyen-du tampon au phosphate. Diluer la suspension-mère au moyen d'un tampon au phosphate contenant 0.01% d'isooctylphénoxy-polyéthoxyéthanol de façon à ramener la concentration à 10 x 10^9 organismes par ml. Inoculer le centre préalablement marqué de chaque carré de tapis au moyen de 0.1 ml de suspension de bactéries. (Conserver la suspension de bactéries pour déterminer les nombres d'inoculations.) Sécher les tapis inoculés pendant 60 minutes, recouverts lâchement de feuilles d'aluminium, dans un incubateur réchauffé à 36°C.

NOTA: Le brossage doit être fait sous une hotte ou dans une boîte à gants. Un grand sac de plastique peut constituer une enceinte de sécurité.

*Official Methods of Analysis, Association of Official Analytical Chemists. 11e édition, 1970.

3. Préparer les brosses en immergant les poils dans des contenants distincts (boîtes de Pétri de 150 mm ou l'équivalent) contenant la solution à l'essai diluée et une solution témoin ne contenant pas de substances actives pendant 15 minutes. (Si l'on ne dispose pas de solution témoin, employer de l'eau distillée stérile contenant 0.01% d'isooctylphénoxy-polyéthoxyéthanol.) Fixer deux morceaux de tapis inoculé portant 12 carrés d'essai sur la planche de montage en clouant chaque angle au moyen de clous de tapisserie; les feuilles d'aluminum recouvrent les témoins afin de les protéger pendant le brossage. Mettre la planche dans une hotte.

4. Appliquer uniformément sur un morceau de tapis portant 6 taches séchées d'inoculum de bactéries une quantité prédéterminee de solution d'essai à la température de 25°C. (Les produits liquides doivent être appliqués à partir d'une quantité mesurée de bouillie, basée sur la quantité de solution excédant 25 ml, appliquée par brossage, suivant la dose d'application recommandée par unité de surface. Les produits solides peuvent être appliqués par poudrage.) Secouer l'excès de solution d'essai sur les poils de la brosse et mettre cette dernière dans une boîte de Pétri contenant 100 ml de solution d'essai. Plonger les poils de la brosse et transférer la quantité de solution retenue par les poils sur une tache du tapis. Brosser la tache pendant 30 secondes en faisant 30 mouvements circulaires dans un sens et 30 autres dans l'autre sens. La surface couverte par ce traitement doit former un cercle d'environ 3 pouces de diamètre autour de chaque tache. Exercer une pression modérée à forte sur la brosse afin de faire pénétrer la solution jusqu'à la base des poils. Replonger la brosse dans la solution d'essai et brosser de la même façon les 5 autres taches. Laisser le tapis traité à la température ambiante pendant 60 minutes pour permettre un séchage partiel des surfaces traitées.

5. Pendant que le tapis traité est laissé à sécher, pulvériser une quantité de solution témoin non active, proportionnellement à la surface, sur 3 des taches d'inoculum séché du tapis témoin. Les 3 autres taches serviront de témoins non brossés pour déterminer la diminution du nombre de bactéries due au séchage. Prendre soin de ne pas humecter ni de brosser les surfaces témoins non brossées. Brosser les 3 taches humectées de la même façon que pour le tapis soumis à l'essai. Laisser sécher les témoins pendant 60 minutes à la température ambiante.

6. Après 60 minutes, finir de découper les carrés de tapis de 2 pouces de côté au moyen d'une pince et d'un couteau désinfectés à la flamme. Mettre chaque carré de tissu dans une bouteille d'extraction distincte contenant du bouillon neutralisant. Agiter vigoureusement chaque bouteille d'extraction pendant au moins une minute afin de libérer les organismes viables des fibres du tapis. Déterminer le nombre d'organismes viables dans chaque bouteille en versant 2 dilutions sur de la gélose des méthodes standards contenant un neutralisant approprié. Déterminer le nombre d'organismes viables dans 0.1 ml de suspension de bactéries employées pour l'inoculation du tapis. Incuber toutes les bouteilles d'extraction afin de déterminer s'il y a eu neutralisation complète ou incomplète des bactéries dans le tapis soumis à l'essai.

7. Déterminer le pourcentage de diminution du nombre d'organismes viables dans le tapis traité en comparant le nombre d'organismes viables dans l'échantillon traité avec le nombre moyen d'organismes viables dans l'échantillon témoin brossé. Pour que l'essai soit acceptable, le nombre d'organismes extraits des taches témoins non brossées doit être 1×10^6 par ml.

Si l'on désire employer cette épreuve pour obtenir des données a l'appui de l'homologation d'un assainisseur pour tapis, le protocole suivant doit être adopté:

1. L'essai doit porter sur 3 échantillons de trois préparations différentes contre chacune des 2 bactéries spécifiées dans la méthode et sur 2 types différents de tapis. Dans chaque cas, la diminution du nombre de bactéries par rapport aux témoins doit être de 99.9%. Si le produit doit être utilisé sur des tapis de catégorie commerciale, 2 tapis représentatifs, par exemple de type tufté en acrylique et en polypropylène, doivent être soumis à l'essai. Aucun tapis ne peut servir de norme. Si le produit est destiné aux tapis de laine, un autre échantillon représentatif doit de plus être soumis à l'essai. Sinon, l'étiquette doit porter une mention à l'effect contraire. Tous les échantillons de tapis soumis à l'essai doivent être identifiés par toutes leurs caractéristiques, et l'on toit donner le type des fibres, le poids des fibres, la densité et la hauteur des poils. Des essais témoins appropriés doivent démontrer qu'aucun agent bactériostatique présent dans les poils ou le canevas du tapis ne fausse les résultats de l'essai.

2. L'essai doit comprendre un échantillon d'une préparation vieillie de 60 jours, sur un échantillon de tapis et contre une bactérie.

La quantité d'assainisseur appliquée sur un morceau de tapis doit être exprimée en gallons de solution diluée par pied carré de tapis, et cette quantité doit être déclarée sur le projet d'étiquette. Cette quantité devrait être de 12 gallons de produit dilué pour 800 à 1,200 pieds carrés de tapis. Si le produit est destiné aux hôpitaux, l'emploi d'un aspirateur de reprise humide doit être spécifié dans le mode d'emploi. Aucun produit dit de traitement à sec ne peut être homologue pour emploi dans les hôpitaux.

Les questions techniques concernant la méthode peuvent être adressées à :
Dr. D.F. Garvin, BASF Wyandotte Corporation, Wyandotte (Michigan) 48192.
Téléphone: 313-282-3300.

INDICATIONS SPÉCIALES POUR LES PRODUITS A BASE D'ACIDE CRESYLIQUE ET DE PHÉNOLS SYNTHÉTIQUES

(Employés comme désinfectants de locaux agricoles)

1. Ne pas utiliser dans les stalles de traite, les salles de traite ni les chambres à lait.

2. Sortir tous les animaux et enlever tous les aliments des locaux, wagons, bateaux, camions et autre matériel.

3. Enlever la litière et le fumier des planchers et des murs, et de toutes les surfaces des étables, cases, stalles, couloirs et autres installations où vivent ou circulent des animaux.

4. Vider tous les auges, rateliers et autres installations d'alimentation et d'abreuvement.

5. Saturer toutes les surfaces avec une solution désinfectante acceptée.

6. Immerger les licous, cordes et autres types de matériel employé pour le maniement et la contention des animaux, de même que les fourches, pelles et grattoirs.

7. Aérer les bâtiments, wagons, navires et autres espaces clos. Ne pas reloger le bétail ni employer le matériel avant que la solution de traitement ne soit absorbée, fixée ou séchée.

8. Les rateliers, mangeoires, auges, alimentateurs automatiques et abreuvoirs doivent être brossés à fond au moyen de détergents et rincés avec de l'eau potable avant de les réutiliser.

Données d'efficacité exigées pour les allégations concernant le pouvoir stérilisant

Employer l'essai des sporicides de l'Association des chimistes analystes officiels. (AOAC Official Methods of Analysis, 11e édition, chapitre 4, page 64-65, 1970), en utilisant:

(a) Trois échantillons de trois préparations différentes sur deux types de porteurs (pénicylindres et boucles de soie pour sutures chirurgicales) et sur les deux organismes d'essai (Bacillus subtilis et Clostridium sporogenes). Faire 30 répétitions pour chaque organisme et sur chaque type de porteur (120 répétitions ou porteurs pour chaque échantillon),

(b) Deux échantillons d'une préparation vieillie aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours, au moyen de 30 répétitions sur les deux organismes nommés ci-dessus et les deux types de porteurs (120 répétitions ou porteurs pour chaque échantillon).

Le nombre total de tubes nécessaires pour un seul essai suivant (a) et (b) ci-dessus est de 600. Dans le cas d'une allégation concernant le pouvoir stérilisant, aucune croissance n'est permise dans aucune des répétitions.

Méthodes d'évalutation de l'activité virucide des désinfectants

Il n'existe actuellement aucune méthode officielle d'évaluation de l'activité virucide des désinfectants. Jusqu'à ce qu'une méthode officielle n'ait été adoptée, la Division acceptera les données appropriées obtenues par toute technique virologique reconnue comme sérieuse. La méthode doit reproduire les conditions réelles d'emploi. Pour cette raison, les données virologiques acceptées sont généralement obtenues par des méthodes d'essai sur porteurs, qui sont les modifications soit de la méthode de dilution d'emploi de l'AOAC (pour les désinfectants liquides de surface), soit l'essai des bouillies germicides sous pression de l'AOAC (pour les désinfectants de surface sous pression). Pour reproduire les conditions d'emploi, le virus spécifique soumis à l'essai doit être inoculé sur des surfaces dures, laissé à sécher, puis traité avec le produit suivant le mode d'emploi de l'étiquette. Les surfaces traitées doivent être examinées après une exposition de dix minutes afin de déterminer si le virus a été inactivé. Comme la plupart des produits germicides sont intrinsèquement toxiques pour les hôtes employés dans les techniques virologiques (en particulier, les cultures de cellules), on devra faire une désintoxication qui rendra le virus traité exempt de germicides persistants ou employer une concentration de virus suffisante pour démontrer une réduction du nombre de virus d'au moins trois puissances (1,000 fois), même si l'on observe une cytotoxicité dans les cultures de tissus.

Les renseignements suivants doivent être fournis pour chaque essai:

1. Les dilutions employées pour récupérer le film de virus sur une surface, par exemple, 10- , 10-2, etc.

2. Témoins: surfaces contaminées par le virus à l'essai: aucun germicide employé; virus récupéré suivant diverses dilutions dans l'hôte (culture de tissus, oeufs avec embryon, injection sur souris, etc).

3. L'activité du germicide sur au moins cinq surfaces différentes (par exemple, des lamelles de verre) contaminées par le virus à l'essai, indiquant la récupération des virus suivant diverses dilutions dans l'hôte.

4. Essais témoins de cytotoxicité: application de germicide sur des surfaces exemptes du virus à l'essai; effet sur l'hôte.

5. Valeur de la L.D. 50 calculée pour les divers essais.

6. Réduction du titre de virus par l'activité du germicide: L.D. 50/ml de l'essai témoin de virus moins L.D. 50/ml du système soumis a l'essai, exprimé en logarithme à base 10 et calculé suivant une méthode statistique (par exemple, Reed et Muench, Litchfield et Wilcoxan).

Le rapport type d'un essai comportant la culture de tissu comprendrait donc les détails des méthodes employées de même qu'un tableau semblable au suivant:

Dilution des virus récupérés sur une surface	Essai germicide (Survie* de virus de la surface traitée)	Essai témoin (Survie de virus de la surface non traitée)	Essai témoin cytotoxicité (Effet toxique du germicide; aucun virus)
10^{-1}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-2}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-3}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-4}	T T T T T	+ + + + +	T T T T T
10^{-5}	T T T O O	+ + + + +	T T T T T
10^{-6}	O O O O O	+ + + + +	O O O O O
10^{-7}	O O O O O	+ + + + +	O O O O O
10^{-8}	O O O O O	+ + + + +	O O O O O
10^{-9}	O O O O O	+ O O O O	O O O O O

* Démontrée par effet cytopathogène, anticorps fluorescents, numération en bote de Pétri, réaction de l'animal ou autre technique acceptable.

Note: T - Toxique; + - virus survivant; O - aucun virus survivant

Les allégations concernant le pouvoir virucide d'un produit doivent se limiter au virus qui ont été effectivement soumis à l'essai. On exige deux essais sur un échantillon pour chaque virus soumis à l'essai. Lorsqu'il y a évidence de cytotoxicité (comme dans le tableau ci-dessus), l'essai doit démontrer une réduction d'au moins 1,000 fois du nombre de virus. Le virucide doit démontré une inactiviation complète du virus tans toutes dilutions.

Si le virus à l'essai ne présente pas de réaction cytopathogène mesurable dans des milieux de sous cultures, l'effet in vitro sera consitéré comme présomptif. Dans ce cas, un essai in vivo confirmatif doit être fait sur un hôte sensible après exposition du virus aux désinfectants.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE D'ESSAI DES PRODUITS AUTO-ASSAINISSEURS PERSISTANTS

Pour appuyer des allégations concernant un produit auto-assainisseur persistant, le demandeur doit soumettre, avant l'homologation, des données démontrant que le produit, lorsqu'il est utilisé conformément au mode d'emploi, abaisse considérablement le nombre de micro-organismes sur des surfaces représentatives traitées, en comparaison de surfaces témoins qui ont été traitées avec le même produit exempt de la substance active. Le protocole suivant doit être suivi:

Trois échantillons de trois préparations différentes doivent être éprouvés contre chacunes des bactéries à l'essai sur au moins cinq répétitions de chaque surface représentative pour laquelle le produit est destiné. De plus, un échantillon vieilli aux fins de l'essai de stabilité après 60 jours doit être éprouvé en double sur une bactérie et au moins cinq répétitions de chaque surface représentative à traiter. Les micro-organismes soumis à l'essai peuvent être Staphylococcus aureus ATCC 6538 et Klebsiella pneumoniae, aberrant, ATCC 4352. Enterobacter aerogenes ATCC 13048 peut remplacer K. pneumoniae. Les surfaces représentatives peuvent comprendre le verre, le métal, les carreaux de céramique vitrifiée ou non vitrifiée, la porcelaine vitrifiée ou des parquets de bois, suivant les usages proposés sur l'étiquette, cette liste n'étant pas limitative. La propagation des cultures et l'emploi de substrats de sous-cultures, ainsi que tout autre matériel connexe doit être conforme aux paragraphes 4.001 et 4.002 du manuel des méthodes de l'AOAC.

Appliquer le produit sur les surfaces d'essai et les surfaces témoins suivant le mode d'emploi de l'étiquette, et laisser sécher complètement les surfaces. Déterminer le nombre de bactéries dans un bouillon de culture incubé pendant 48 heures, et étendre de 0.01 à 0.03 ml de bouillon de culture sur des carrés d'un pouce de côté de chaque surface d'essai au moyen d'une boucle d'ensemencement bactériologique. Les carrés doivent être mis à sécher pendant 20 à 30 minutes dans un incubateur bactériologique à 30 à 37°C. Un essai de récupération au temps zéro doit être fait afin de démontrer l'efficacité du processus de récupération, et ses résultats doivent être consignés. L'essai au temps zéro doit démontrer la perte de viabilité au cours du séchage. Un nombre minimale de 1×10^6 organismes par surface à l'essai doit être récupéré après le séchage pour que l'essai soit considéré comme valable.

Après un intervalle de temps convenable, récupérer les organismes en lavant les carrés en les agitant dans un milieu approprié ou un liquide de dilution contenant une gélose nutritive appropriée contenant les mêmes neutralisants, par versage ou épendage en boîte de Pétri. L'essai doit comprendre des intervalles d'exposition de zéro, trente minutes, une heure, trois heures et six heures, et les résultats de chaque surface traitée de même que chaque témoin doivent être consignés.

Pour que le produit ait une valeur pratique, les résultats de l'essai doivent démontrer une diminution du nombre de bactéries d'au moins 99.9% par rapport aux témoins au cours des trois heures qui suivent.

References

AATCC Test Method 90-1965. Antibacterial activity of fabrics, detection of: agar plate method, in AATCC Technical Manual, 1968 Ed., published by American Association of Textile Chemists and Colorists, P.O. Box 12215, Research Triangle Park, North Carolina 27709,

AATCC Test Method 100-1965. Antibacterial finishes on fabrics, evaluation of, in AATCC Technical Manual, 1968 Ed., published by American Association of Textile Chemists and Colorists, P.O. Box 12215, Research Triangle Park, North Carolina 27709.

ASTM Test Method D-2574-67T. Test for resistance of emulsion paints in the container to attack by microorganisms. Am. Soc. for Testing and Materials, 1916 Race Street, Philadelphia, Pennsylvania 19103.

Biological analysis of subsurface injection waters, API recommended practice for, API-RP-38, Second Edition. Dec. 1965. American Petroleum Institute, Div. of Production, 300 Corrigan Tower Bldg., Dallas, Texas 75201.

British Standards Institution 1956 British standard technique for the preliminary assessment of aerial bactericides. B.S. 2796, 14 pp. British Standards House, 2 Park Street, London, W. 1.

Litchfield, J . T., Jr., and F. Wilcoxon. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. Exptl. Therap, 96: 99-113.

McGray R. J . 1970. A test method for the evaluation of air sanitization. Proc. Chem. Specialties Manufact. Assn., 106-111.

Official Methods of Analysis. Chapter 4 - Disinfectants, pp. 59 - 72, Eleventh Ed., 1970 and Supplements in 1971 and 1972; published by the Association of Official Analytical Chemists, Inc., P.O. Box 540, Benjamin Franklin Station, Washington, D. C. 20014.

Petrocci, A. N. and Clarke, Paul. 1969. Proposed test method for antimicrobial laundry additives. Journal of the AOAC. 52, 836 - 842.

Proposed procedures for the screening of microbial inhibitors in hydrocarbon/water systems. Publication, Number 2, July 1966, Society for Industrial Microbiology, 3900 Wisconsin Ave., N.W., Washington, D.C. 20016.

Reed, L. J., and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty per cent end points. Amer. Jour. Byg. 27: 293-497.

Stuart, L. S. 1969. Testing sterilizers, disinfectants, sanitizers and bacteriostats. Soap and Chem. Specialties. 45, 79 - 80 and 84 - 85.

Stuart, L. S. and Friedl, J. L. 1955. Testing aerosol products for gerticidal and sanitizing activity. Proc. Chem. Specialties Manufact. Assn., 93 - 97.